

UNIVERSITE
D'ABOMEY-CALAVI



UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUE DU
LANGUEDOC



THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir les grades de

**DOCTEUR DES UNIVERSITES DE MONTPELLIER II
ET D'ABOMEY-CALAVI**

Discipline : Chimie Organique, Alimentaire, Industrielle, Catalyse
Enzymatique et Technologie Alimentaire

Formations Doctorales : CHIMIE ET APPLICATIONS / SCIENCES DES
PROCEDES - SCIENCES DES ALIMENTS

Présentée et soutenue publiquement
Par

Fidèle Paul TCHOBO

**Caractérisation du Beurre de *Pentadesma butyracea*
Sabine, fonctionnalisation des triacylglycérols par
transfert acyle sélectif en biocatalyse**

Directeurs de thèse :

Pr. Mohamed Mansourou SOUMANOU

Dr. HDR Pierre VILLENEUVE

JURY

M. K. Dominique SOHOUNHLOUE

M. Pierre VILLENEUVE

M. Mohamed M. SOUMANOU

M. Joël SCHER

M. Joseph HOUNGNIGAN

Professeur, Université d'Abomey-Calavi, (Président)

HDR, Université Montpellier II

Professeur, Université d'Abomey-Calavi

HDR, Université Montpellier II

Professeur, Université d'Abomey-Calavi

Membres

Année académique 2007-2008

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

- Dieu le Tout-Puissant.
- ma fille et sa mère.
- Mes parents.
- Mes frères et sœurs.
- Mes neveux et nièces.
- Mes oncles, tantes, cousins, cousines et particulièrement à Edgar TCHOBO et Monique TOSSOU.

Remerciements

Les travaux qui font l'objet de cette thèse ont été effectués au Laboratoire d'Etude de Recherche et en Chimie Appliquée (LERCA) dirigé par le Professeur Dominique SOHOUNHLOUE et au laboratoire de Lipotechnie du CIRAD (UMR-IATE) dirigé par le Dr. HDR. Pierre VILLENEUVE.

Que le Professeur Dominique SOHOUNHLOUE soit vivement remercié d'une part pour avoir dirigé mes premiers pas dans la recherche et d'autre part pour avoir œuvré à la finalisation de ce travail. Bâtisseur et rassembleur, il a su par sa vision développer en nous l'esprit du travail bien fait. Pour avoir bien voulu me faire l'honneur de présider ce jury, qu'il reçoive ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je ne saurais exprimer ma gratitude au Docteur. HDR. Pierre VILLENEUVE, co-directeur de cette thèse, pour son accueil si chaleureux au sein de son laboratoire. Son dynamisme, sa disponibilité et ses qualités scientifiques, m'ont été très utiles et ont contribué à mener à bien ce travail. Qu'il trouve ici toute ma sympathie et ma reconnaissance.

Je remercie le Professeur Mohamed SOUMANOU, également co-directeur de cette thèse, qui n'a ménagé aucun effort pour m'apprendre les rudiments de la catalyse enzymatique dans mes débuts. Il a mis tout en œuvre pour assurer ma formation tout au long du travail. Qu'il veuille accepter le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement le Professeur Joseph HOUNHOUIGAN, pour avoir accepté malgré ses multiples occupations d'apprécier ce travail en tant que rapporteur et de participer au jury de cette soutenance.

J'exprime toute ma reconnaissance au Docteur. HDR Joël SCHER, pour avoir bien voulu juger ce travail en qualité de rapporteur.

Que le professeur Gnon BABA, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Kara (TOGO), trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Docteur HDR Michel PINA, les Docteurs Fabrice TURON, Jérôme LECONTE, Claire BOURLIEU, messieurs Georges PIOMBO, Bruno BAREA et mesdames Nathalie BAROUH, Clara LACHGAR, Marie-Pierre OBEDE pour les témoignages de soutien et les précieux conseils pendant mon séjour en France et tout au long de la rédaction du présent travail.

Je remercie particulièrement monsieur et madame PIOMBO pour les témoignages d'affections fraternelles, loin de chez nous, vous avez été notre famille.

Je tiens à remercier le Professeur Félicien AVLESSI, les Docteurs Justine DANGO, Valentin WOTTO et Edwige AHOUSI-DAHOUENON pour leurs précieux conseils.

J'adresse mes sincères amitiés aux Docteurs Guy ALITONOU et Sébastien DJENONTIN, pour leur indéfectible soutien.

A mes amis thésards, Emmanuelle CAMBON, Luis LOPEZ-GIRALDO, Mickaël LAGUERRE, Isabelle MARCHAVAL, Jean-Pierre NOUDOGBESSI, Pascal AGBAGNAN, Sophie BOGNINOU, Diane BOTHON pour leur convivialité et la bonne ambiance au Laboratoire, qu'ils trouvent ici l'expression de ma cordiale reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Martin KEKE, Vahid AISSI, Clémence GUERIN pour leur bonne humeur à la paillasse et à Nikita TOPANOU, Ludovic AGBADJA, Eric ALAMOU, Dieu-donnée KPATCHI pour leur soutien.

Enfin, Je suis reconnaissant à Arnaud SAGBO dont la compétence a permis la mise en forme de ce document.

Liste des publications

Fidèle P. Tchobo, Armand K. Natta, Bruno Barea, Nathalie Barouh, Georges Piombo, Michel Pina, Pierre Villeneuve, Mohamed M. Soumanou and Dominique C. K. Sohounhloue
Characterization of *Pentadesma butyracea* sabine Butters of Different Production Regions in Benin, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 (8) : 755-760 (2007)

Mohamed M. SOUMANOU, Fidèle P. TCHOBO, Aléodjrodo P. EDORH, Georges ACCROMBESSI : **Valorisation des huiles végétales d'origine béninoise par alcoololyse enzymatique**, *OCL* 12 (4) : 320-325 (2005).

Liste des abréviations

ADF	: Fibre au détergent acide
ADL	: Lignine sulfurique
AG	: Acide gras
AGCL	: Acide gras à chaîne longue
AGCM	: Acide gras à chaîne moyenne
AGL	: Acide gras libre
AGMI	: Acide gras monoinsaturé
AGPI	: Acide gras polyinsaturé
AGS	: Acide gras saturé
a_w	: Activité thermodynamique de l'eau
BC	: Beurre de cacao
BK	: Beurre de karité
BP	: Beurre de <i>Pentadesma</i>
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
DAG	: Diacylglycérol
DHA	: Acide docosahexanoïque
DSC	: Calorimétrie à balayage différentiel
EAGCL	: Ester d'acide gras à chaîne longue
EAGCM	: Ester d'acide gras à chaîne moyenne
EPA	: Acide eicosapentanoïque
HDL	: High density lipoprotein
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance
I_a	: Acidité
LDL	: Low density lipoprotein
MAG	: Monoacylglycérol
NDF	: Fibres au détergent neutre
OOO	: trioléine
PB	: Papaye lyophilisée
POO	: Palmitylldioléylglycérol
POP	: dipalmitylstéaryl glycérol
POS	: Palmitylstéaryloléylglycérol
PS	: Papaye Sigma
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
SOO	: stéarylldioléylglycérol
SOS	: distéaryloléylglycérol
TAG	: Triacylglycérols
T_E	: Teneur en eau et matières volatiles
T_{ins}	: Teneur en insaponifiable
TMG	: Teneur en matière grasse

Table des matières

DEDICACES.....	i
Remerciements	ii
Liste des publications	iv
Liste des abréviations	v
Table des matières.....	vi
Introduction.....	1
Revue Bibliographique.....	3
I- Les huiles et graisses végétales	4
I.1- Structures	4
I.1.1- Les Triacylglycérols (TAG) et leurs propriétés.....	4
I.1.1.1- Les acides gras (AG)	6
I.1.1.2- Absorption des TAG	9
I.1.1.3- Rôle énergétique et structural.....	10
I.1.2- Les phospholipides	11
I.1.3- Les phytostérols.....	11
I.1.4- les tocophérols	14
I.2- Procédés de modifications des huiles végétales	15
I.2.1- Hydrogénation	15
I.2.2- Interestérification chimique	16
I.2.3- Fractionnement	17
I.2.4- Procédés Enzymatiques	18
I.2.4.1- Généralités sur les lipases	18
I.2.4.2- Spécificité des lipases	19
I.2.4.3- Origines des lipases	21
I.2.4.4- Production des triacylglycérols spécifiques ou restructurés	22
I.2.4.4.1- Les triacylglycérols à chaîne moyenne (MLM).....	23
I.2.4.4.2- Les équivalents de Beurre de Cacao	24
II-Généralités sur le <i>P. butyracea</i> Sabine.....	26
II.1- Description Botanique du <i>P. butyracea</i>	26
II.2- Extraction du beurre de <i>P. butyracea</i> en milieu Paysan.....	28
II.3- Travaux antérieurs sur la graine de <i>P. butyracea</i>	29
II.4- Utilisation du <i>P. butyracea</i> Sabine.....	29
II.5- Commercialisation du beurre de <i>P. butyracea</i>	31
Matériels et Méthodes.....	32
I- Matériels	32
II- Méthodes	35
II.1- Extraction et caractérisations des Beurres	35
II.1.1 Teneur en eau et matières volatiles	35
II.1.2- Extraction au Soxhlet et teneur en matière grasse (TMG)	35
II.1.3- Mesure de l'acidité des beurres	36
II.1.4- Détermination de la teneur en insaponifiable.....	37
II.1.5- Composition en acides gras	37
II.1.5.1- Préparation des réactifs.....	38

II.1.5.2- Préparations des esters méthyliques des acides gras	38
II.1.5.3- Analyse Chromatographique des esters méthyliques d'acides gras	39
II.1.6-Détermination de la répartition des acides gras des.....	39
triacylglycérols des différents beurres de <i>P. butyracea</i>	39
II.1.7- Détermination de la composition en stérols des beurres	41
II.1.7.1- Extraction des insaponifiables en vue du dosage des	41
phytostérols.....	41
II.1.7.2- Dosages des stérols par CPG.....	41
II.1.8- Détermination du profil triglycéridique.....	42
II.1.9- Analyse des tocophérols.....	43
II.1.10- Détermination de la teneur en solide des différents beurres	43
par RMN pulsée basse résolution.....	43
II.1.10.1- Principe de la méthode.....	43
II.1.10.2- Conditions opératoires	45
II.1.11- Détermination des comportements thermiques des beurres	45
de <i>P.butyacea</i> par DSC	45
II.2- Caractérisation des tourteaux délipidés.....	47
II.2.1- Détermination de la teneur en phénols totaux dans les	47
tourteaux	47
II.2.1.1- Extraction des phénols	47
II.2.1.2- Dosage colorimétrique des composés phénoliques.....	48
II.2.2- Composition en glucides.....	49
II.2.2.1- Extraction des glucides	49
II.2.2.2- Analyse par chromatographie ionique	50
II.2.3- Déterminations des constituants pariétaux suivant la	51
méthode aux détergents : séquences dites de Van Soest.	51
II.2.3.1- Préparation des solutions.....	51
II.2.3.2- Préparation des échantillons.....	52
II.2.4- Dosage des minéraux et des éléments majeurs dans les	54
tourteaux	54
II.2.4.1- Minéralisation voie sèche double calcination avec l'acide.....	55
fluorhydrique.....	55
II.2.4.2- Dosage, par spectrométrie d'émission plasma I.C.P.....	56
VARIAN-VISTA (P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Al et B)	56
II.2.4.3- Détermination de la teneur en azote total après	57
combustion sèche (Méthode Dumas) (analyse	57
élémentaire LECO-FP 528)	57
II.2.5- Dosage des protéines dans les tourteaux.....	57
II.2.5.1- Acides aminés liés.....	58
II.2.5.2- Acides aminés libres	58
II.3- Synthèse d'un équivalent de Beurre de Cacao.....	60
II.3.1- Utilisations des lipases microbiennes.....	60
II.3.1.1- Choix du Rapport molaire.....	60
II.3.1.2- Fractionnement du beurre.	60
II.3.1.3-Transestérification du beurre Fractionné.....	60
II.3.1.4- Purification des produits de la réaction et caractérisation	61
par DSC	61
II.3.1.5- Etude de la cinétique de transestérifications à différentes.....	61
activités de l'eau	61
II.3.1.6- Etude de la variation de la quantité de catalyseur, de la	61
température et du solvant.....	61
II.3.2- Utilisation des lipases végétales	62
II.3.2.1- Isotherme de sorption et désorption du latex de papaye	62
lyophilisée.....	62
II.3.2.2- Mesure de l'activité du latex de papaye lyophilisé.....	63
II.3.2.2.1- Mesure de l'activité en hydrolyse	63
II.3.2.2.2- Détermination de l'aptitude à l'interestérification	63

II.3.2.3- Utilisation dans la synthèse d'équivalent de Beurre de	64
Cacao	64
Résultats et discussion	65
I- Caractérisation de la graine de <i>P. butyracea</i>	65
I.1- Extraction et caractérisation des différents beurres de <i>P. butyracea</i>	65
I.1.1- : Acidité, teneurs en eau et en huile des amandes	65
I.1.2- Teneur en insaponifiable	66
I.1.3- Composition en acides gras (AG)	66
I.1.4- Répartition des acides gras des triacylglycérols des différents beurres de <i>P. butyracea</i>	68
I.1.5- Composition en triacylglycérols (TAG)	70
I.1.6- Composition en stérols	72
I.1.7- Composition en tocophérols	74
I.1.8- Caractérisation physique	75
I.1.8.1- Teneurs en solide des différents beurres de <i>P. butyracea</i> par RMN	75
I.1.8.2- Etude du profil de fusion et de la teneur en solide obtenu par DSC	77
I.1.8.2.1- Profil de fusion	77
I.1.8.2.2- Teneur en solide par DSC et comparaison avec les valeurs obtenues par RMN	79
I.2- Caractérisation des tourteaux délipidés de <i>P. butyracea</i>	81
I.2.1- Analyse de la teneur en fibre	81
I.2.2- Composition en minéraux et éléments majeurs	82
I.2.3- Composition en sucres	83
I.2.4- Teneur en polyphénols totaux	84
I.2.5- Composition en acides aminés	85
II- Biofaçonnement du Beurre de <i>P. butyracea</i> sabine : Synthèse d'un équivalent de Beurre de Cacao	87
II.1- Réaction d'acidolyse au moyen des lipases microbiennes	87
II.1.1- Acidolyse par la lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i>	87
II.1.2- Acidolyse par la lipase de <i>Candida antarctica</i>	88
II.2- Réaction de Transestérification au moyen des lipases microbiennes	89
II.2.1- Transestérification par la lipase de <i>thermomyces lanuginosa</i>	89
II.2.2- Transestérification par la lipase de <i>Candida antarctica</i>	91
II.3- Obtention de la stéarine de <i>P. butyracea</i> après fractionnement du beurre	92
II.3.1- Composition en acides gras des différentes fractions	93
II.3.2- Composition en triacylglycérols des différentes fractions	94
II.4- Transestérification de la stéarine	95
II.4.1- Etude de l'influence de l'activité de l'eau	96
II.4.2- Caractérisation des produits de réaction (DSC)	97
II.4.3- Etude de la variation de la quantité de lipase	99
II.4.4- Etude de variation de la température	99
II.4.5- Etude de la nature du solvant	100
II.5- Application aux lipases végétales	101
II.5.1- Activité lipolytique par pH-stat	101
II.5.2- Influence de l'environnement aqueux	102
II.5.3- Utilisations des différentes lipases végétales dans la synthèse d'un équivalent de beurre de cacao	105
Conclusion	107
Références Bibliographiques	109

La flore a permis à l'homme à travers les fruits et les graines de diversifier sa gamme de corps gras. Avec le développement des techniques de raffinage, on a pu ainsi augmenter considérablement le nombre et la qualité des matières grasses. Cependant avec l'essor des industries agroalimentaires, de nouvelles exigences (liées aux propriétés physiques, chimiques, et nutritionnelles) ont été imposées aux corps gras. Pour répondre à ces préoccupations, les techniques d'hydrogénation, de fractionnement et d'interestérification chimique ont été développées en appui au raffinage.

Aujourd'hui, avec l'évolution de la biotechnologie, on peut adapter les corps gras aux besoins nutritionnels et aux exigences des industries. Toutefois, les premiers travaux de modification des graisses et des huiles par des réactions d'interestérification catalysées par des lipases ont été étudiés dans les années 80 (Undurraga et *al.* 2001). Ces travaux ont permis à travers la gamme variée de produits écologiques obtenus à savoir « les monoalkylglycérols, les dimères d'ester, les esters d'acide isostérique, les triacylglycérols à courtes et moyennes chaînes », d'obtenir des matières grasses potentielles pour les industries.

Le beurre de cacao constitue aujourd'hui une matière première très importante pour l'industrie du chocolat et de la confiserie grâce à ses propriétés physiques liées à sa composition. Cependant la production limitée et le déséquilibre de l'offre par rapport à la demande amènent à un prix élevé de la matière première et donc du produit final. Cette situation impose une utilisation des matières de remplacement. Ainsi plusieurs travaux ont permis la synthèse d'équivalent de beurre de cacao à partir de la stéarine de palme par interestérification biocatalysée (Abigor et *al.*, 2003 ; Undurraga et *al.*, 2001 ; Bloomer et *al.*, 1990). Toutefois de nouveaux horizons pour la synthèse d'équivalent de beurre de cacao par la diversification de la matière première de synthèse restent à explorer. Ainsi, Les travaux de Wang et *al.* (2006) ont permis la synthèse d'équivalent de beurre de cacao par interestérification enzymatique des huiles extraites de graines de thé.

Le présent travail a été réalisé dans le but de trouver les moyens de valoriser la graine d'un arbre à buts multiples « le *P. butyracea Sabine* » par la caractérisation de sa graine et par

la modification de son beurre par voie enzymatique en vue d'une utilisation potentielle en industrie agroalimentaire comme équivalent de beurre de cacao.

Le présent document sera divisé en trois chapitres :

Dans le premier chapitre des concepts importants pour la compréhension de ce document seront exposés. Les notions fondamentales relatives aux travaux de caractérisation des lipides et d'enzymologie seront explicitées.

Le deuxième chapitre traitera des matériels et méthodes utilisés et comprendra deux volets dont le premier s'étendra sur les techniques de caractérisation du beurre de *P. butyracea* et des tourteaux, tandis que le second abordera les procédés de biofaçonnement du beurre de *P. butyracea*.

Le troisième chapitre consacré aux résultats et à la discussion est subdivisé en deux parties :

- La première sera réservée à l'évaluation du potentiel nutritionnel de la graine de *P. butyracea* par la caractérisation de l'huile extraite des graines de différentes régions d'une part et à la caractérisation des tourteaux délipidés en vue de leur valorisation d'autre part.
- Quant à la seconde partie, elle sera consacrée à la bioconversion du beurre de *P. butyracea* en vue de l'obtention d'un équivalent de beurre de cacao au moyen des lipases microbiennes et végétales.

Outre le bois, la flore tropicale offre par sa richesse et sa diversité, une multitude de plantes collectées et utilisées par les populations rurales (Ambé, 2001 ; Sinsin et Sinadouwirou, 2003; Makita-Madzou, 1985; Adjanohoun, *et al.* 1988; Hladick *et al.* 1989; Hecketsweiler et Mokoko-Ikonga 1991; Borobou-Borobou 1994).

En Afrique occidentale 350 espèces environ de plantes sauvages comestibles ont été recensées et décrites (Baumer 1995). L'expansion de certaines cultures de rentes et les feux de brousse mettent à mal la base génétique de ces espèces. Cependant, les plus connues et les plus couramment utilisées font l'objet de protection sous diverses formes (maintien dans les cultures, en jardin de case, haies vives, parcs, etc.).

Les différentes espèces rencontrées fournissent aux populations rurales les produits indispensables à leur survie, à savoir substances médicinales, fruits, noix, résines, fibres, fourrages, feuilles-légumes, fruits, etc. Ces produits vendus ou autoconsommés participent à l'économie des ménages, au maintien de l'équilibre alimentaire et à la conservation de la diversité biologique des ressources forestières, bien que l'évaluation de la consommation des plantes sauvages au niveau nutritionnel présente des difficultés. A titre d'exemples, la transformation et la vente des noix de palmier babassou représentent 25% du revenu des femmes au nord-est du Bénin (Sinsin et Sinadouwirou 2003).

Dans cette famille de plantes sauvages, certains oléagineux sont d'importance capitale dans l'apport en matière grasse dans l'alimentation et comme source de revenu pour les paysans. C'est le cas du *Vittelaria paradoxa* (karité) et du *P. butyracea Sabine*. Si le karité est connu pour son beurre dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique, celui du *P. butyracea Sabine* fait, simplement l'objet d'utilisation locale.

Dans le présent paragraphe, après un bref aperçu sur la structure des huiles végétales et les procédés de transformations des corps gras, nous ferons une revue des acquis culturels et des utilisations du *P. butyracea Sabine*.

I- Les huiles et graisses végétales

Les huiles et graisses végétales sont extraites de la graine ou du fruit oléagineux. Les huiles végétales sont généralement consacrées à l'alimentation et sont d'importantes sources d'énergie. Elles sont utilisées pour l'alimentation soit directement ou après modification au moyen des technologies appropriées à grande échelle.

I.1- Structures

Les huiles et graisses végétales sont constituées de deux grandes fractions, la fraction saponifiable et la fraction insaponifiable.

La fraction saponifiable qui représente plus de 95% de l'huile est composée d'un mélange de triacylglycérols en large majorité, de glycolipides, de phospholipides et les produits d'hydrolyse des triacylglycérols que sont les diacylglycerols, les monoacylglycérols et les acides gras libres.

La fraction insaponifiable qui fait moins de 5% (sauf dans le cas du beurre de karité compris entre 5 et 15%) dans laquelle se trouve les phytostérols (stérols des végétaux), les tocophérols, hydrocarbures et les pigments.

Parmi les huiles végétales, on distingue les huiles fluides, liquides à la température de 15°C et les huiles concrètes, solides à la même température.

I.1.1- Les Triacylglycérols (TAG) et leurs propriétés

Ce sont les principaux constituants des huiles et graisses ; Ils comptent pour près de 95 à 99% de la fraction saponifiable. Les TAG sont des triesters du glycérol et des acides gras (Figure I 1). Lorsque les groupes acyles sont identiques, le TAG est homogène ; dans le cas contraire, il est dit mixte. Les TAG sont caractérisés par leur nombre de carbone (CN) et par leur degré d'insaturation. C'est ainsi qu'on observe une grande diversité de TAG isomères, dans lesquels l'on trouve les isomères : de position, géométriques et optiques.

On peut dénombrer les isomères possibles de TAG d'une huile renfermant n acides gras (Tableau I-1) (Merritt et al). Cependant, la répartition des acides gras sur les trois fonctions alcool du glycérol ne répond pas aux lois statistiques.

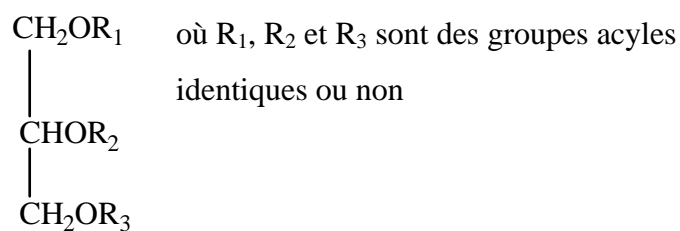


Figure I 1 : Structure chimique d'un triacylglycérol

Tableau I-1 : Nombres de TAG d'une matière grasse contenant n acides gras différents

Nombre d'acides gras (n)	Nombres total des isomères n^3	Sans distinction des isomères de position $(n^3+3n^2+2n)/6$	Sans distinction des isomères optiques $(n^3+n^2)/2$
1	1	1	1
2	8	4	6
3	27	10	18
4	64	20	40
5	125	35	75

En général les lipides à travers les TAG sont d'abord des substrats énergétiques (1g fournit 9 kCal), car leur oxydation fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement des organes. Ils rentrent aussi dans la constitution de la structure des membranes cellulaires et assurent des fonctions vitales.

Ces différentes propriétés sont liées à la nature et la position des acides gras sur le glycérol.

I.1.1.1- Les acides gras (AG)

Les acides gras naturels non dégradés ne portent qu'un seul groupement carboxyle (COOH), ils sont dits monocarboxyliques. Ils sont peu abondants à l'état libre et on les trouve le plus souvent sous forme de triacylglycérols (TAG), d'esters ou encore d'amides. Ils se caractérisent par la longueur de leur chaîne carbonée souvent paire et non ramifiée, leur degré d'insaturation et la nature de leurs isomères.

- Les acides gras sont classés en trois groupes en fonction du squelette carboné dont la numérotation des carbones se fait à partir du carbone du groupe carboxyle.
 - Les acides gras à courte chaîne ont une chaîne carbonée comprise entre 2 et 6 atomes de carbone. On les rencontre dans le lait. Très peu calorifiques, ils sont rapidement absorbés lors de la digestion.
 - Les acides gras à chaîne moyenne avec un nombre de carbone compris entre 8 et 14 atomes, on les retrouve majoritairement dans l'huile de coco et de palmiste.
 - Les acides gras à longue chaîne composés de 14 à 24 atomes de carbone, proviennent des huiles végétales, de poissons et de graisses animales.
 - Dans des cas assez rares, les chaînes alkyles des acides gras sont constituées de nombre impair de carbone, ramifiées, elles possèdent alors des cycles saturés à la place de doubles liaisons, triple liaison ou une fonctionnalisation. L'huile de ricin en est un exemple car renferme l'acide ricinoléique et acide 9,10-dihydrostéarique qui possèdent des fonctions hydroxyles

Par convention, chaque acide gras peut être désigné par la lettre C et une succession de chiffres et de signes, le premier chiffre indiquant le nombre d'atomes de carbone suivi du signe ' : '. Ainsi, un acide gras dénommé C12 : ... désigne un squelette carboné de 12 atomes de carbone.

L'insaturation est définie par le nombre de doubles liaisons dans la chaîne carbonée de l'acide gras. A l'état naturel, on trouve jusqu'à 6 doubles liaisons dans les acides gras, ces doubles liaisons sont généralement séparées par un groupement méthylène (-CH₂) et en configuration (Z). Dans la dénomination commune le nombre de double liaison est indiqué par le chiffre qui suit celui du nombre d'atome de carbone. L'absence de double liaison caractérise les acides gras saturés (par exemple C16 :0). Une double liaison caractérise les acides gras monoinsaturés (C 18 :1). Les acides gras ayant deux ou plus de doubles liaisons

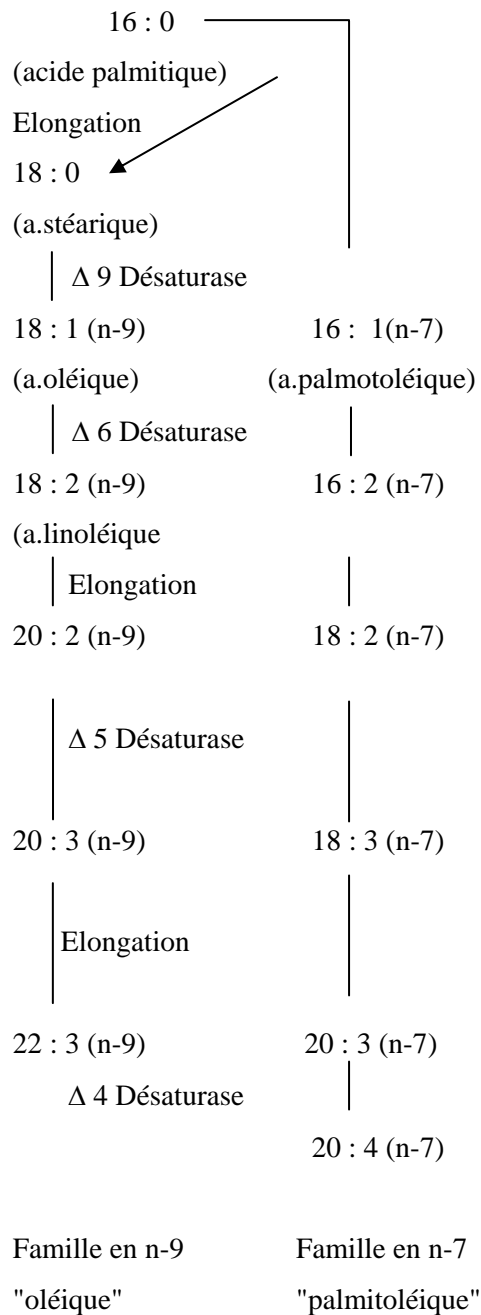
sont polyinsaturés (C18:2 et C18:3). Cependant certains acides gras comme l'acide heptadécanoïque, l'acide éléostéarique et l'acide ruménique possèdent des doubles liaisons de configuration (E).

Les doubles liaisons sur la chaîne carbonée rendent les acides gras sensibles aux phénomènes de peroxydation particulièrement sous l'effet de l'oxygène de l'air, des UV et de la température.

En considérant la nomenclature biochimique, la place de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle de la chaîne carbonée définit la famille à laquelle appartient un acide gras qu'il soit mono ou polyinsaturé. Cette famille est identifiée par la lettre ω ou le sigle n- suivi d'un chiffre indiquant la place de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle de la chaîne carbonée. Ainsi, un acide gras $\omega 9$ ou le sigle n-9 aura une double liaison entre les carbones 9 et 10 et s'il est polyinsaturé, les autres doubles liaisons seront sur des carbones de rang supérieur. Les acides gras insaturés jouent un rôle physiologique important à cause de leur diversité d'actions dans l'organisme. On les distingue par deux groupes qui sont les acides gras essentiels et les acides gras non essentiels.

Les acides gras non essentiels composés de la famille de l'acide oléique ($\omega 9$) et la famille de l'acide palmitoléique ($\omega 7$), ont des précurseurs (acides palmitoléique et oléique) synthétisés par l'organisme. Tandis que les acides gras essentiels de la famille linoléique ($\omega 6$) et la famille de l'acide linoléique ($\omega 3$) ont des précurseurs d'origine exclusivement exogène. La Figure I 2 résume les voies de synthèse des acides gras insaturés par action des désaturases.

Deux familles des AG non essentiels



Deux familles des AGE

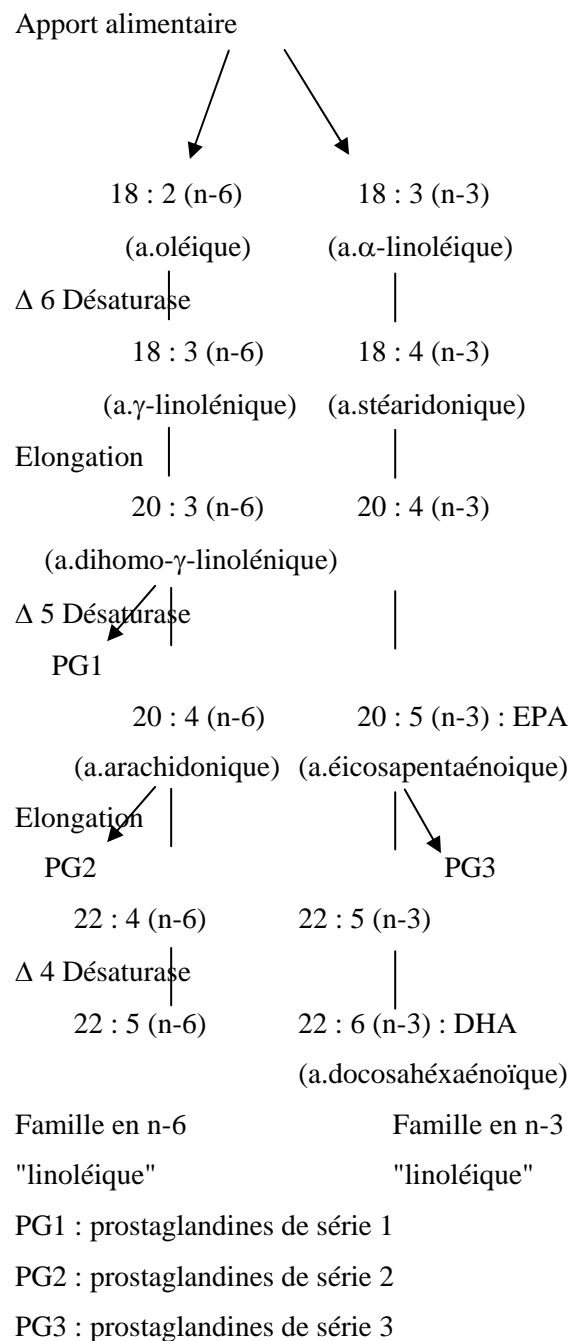


Figure I 2: synthèse des acides gras polyinsaturés chez l'homme

- La position des acides gras sur le TAG influence son devenir dans les différentes étapes de la digestion dans l'organisme. Le positionnement des acides gras sur le TAG est symbolisé par le sigle « *Sn* » (stereo number). Cette numérotation définie selon la projection de Fischer permet de préciser la structure des isomères de position et des isomères optiques. Les atomes de carbone du glycérol sont numérotés de 1 à 3, le groupe carboxylique du deuxième atome de carbone est placé à gauche, noté C-2, ainsi le carbone au dessus est le carbone C-1 et celui en dessous est noté C-3. Les acides gras selon leur disposition sur le glycérol, seront désignés par *Sn*-1, *Sn*-2 et *Sn*-3. De la sorte, une seule molécule se trouve identifiée en précisant par ordre, les positions *Sn*-1, *Sn*-2 et *Sn*-3 [Mu et Hoy, 2004 ; Grondin et al., 1997].

I.1.1.2- Absorption des TAG

Les lipases pancréatiques sont responsables de la digestion des TAG, qui constituent 95 à 98% des graisses alimentaires ingérées. Elles hydrolysent les liaisons esters en position *Sn*-1 et *Sn*-3, pour libérer les acides gras (AG), les diacylglycérols (DAG) et les monoacylglycérols (MAG). C'est sous la forme monoglycéridique que les TAG sont absorbés par les entérocytes avant leur reconstitution. Les TAG reconstitués sont incorporés dans des lipoprotéines appelées « chylomicrons » qui les transportent par les voies lymphatiques puis à travers la circulation sanguine. La régiospécificité des TAG influence la taille des chylomicrons et aussi le métabolisme du cholestérol ester et des acides gras polyinsaturés. Les lipoprotéines formées sont transportées vers le foie si elles ont une haute densité (*High Density lipoprotein* HDL) ou vers les cellules si elles ont une faible densité (*Low density lipoprotein* LDL).

La consommation des TAG à C16:0 en position *Sn*-2 a permis de comprendre l'influence du positionnement des acides gras sur le glycérol ainsi que l'importance de la substitution en position *Sn*-2. Ce constat est à la base des formulations des substituts de lait maternel (Betapol) (Lucas et al. 1997).

Quant aux acides gras libérés dans la digestion, ils sont différemment absorbés selon leur volume hydrocarboné et leur degré d'insaturation. Les acides gras à courte et moyenne chaîne, en raison de leur nature hydrophile, sont rapidement absorbés dans l'estomac et reversés dans le sang par simple diffusion et conduit vers le foie [Osborn et Akoh, 2002, Mu et Porsgaard, 2005]. Les travaux de Mu et Hoy (2001) ont permis de mettre en évidence la

facilité d'absorption des acides gras à courte chaîne et leur rapide disponibilité. De plus, ces travaux ont mis aussi en exergue la diminution de la disponibilité de ces acides gras en fonction de l'augmentation du squelette carboné.

Les acides gras à longue chaîne ne sont pas ou sont très peu absorbés dans l'estomac car en plus de leur caractère hydrophobe, ils sont évacués dans les selles sous forme de sels de calcium insolubles avec des cations divalents, au pH alcalin du suc intestinal ; et ceci s'observe mieux pour l'acide palmitique qui présente un point de fusion très proche de la température corporelle. En revanche, ils sont réestérifiés et participent à la restructuration des triacylglycérols incorporés dans les lipoprotéines à partir des monoglycérides.

I.1.1.3- Rôle énergétique et structural

Les TAG sont stockés dans le tissu adipeux. Grâce à l'oxydation, les acides gras saturés assurent la grande partie de la dépense énergétique de l'organisme. Ils constituent des substrats énergétiques particuliers pour les muscles squelettiques, le muscle cardiaque et le foie. Cependant les acides gras saturés ont une mauvaise réputation, on pense qu'ils augmentent la cholestérolémie. L'effet de ces acides gras s'expliquerait dans la diminution de l'activité du LDL récepteur. Ces lipoprotéines (LDL) transportent le cholestérol vers les cellules et sont responsables, dans les cas d'environnement pathogène ou de prédisposition congénitale du dépôt de plaques d'athérosclérose dans les vaisseaux sanguins, elles sont qualifiées de mauvais cholestérol. Toutefois, l'acide stéarique, une fois dans l'organisme se désature en acide oléique dont le rôle est d'abaisser le taux de cholestérol total et celui du LDL, provoquant ainsi une élévation de la teneur en lipoprotéine de haute densité (HDL, bon cholestérol).

Au niveau structural, les lipides à travers les phospholipides contribuent à l'architecture des membranes cellulaires. La composition en acides gras des phospholipides régule la fluidité membranaire. Cette composition en acide gras des phospholipides membranaires est influencée par la disponibilité des acides gras sanguins, elle-même dépendante des lipides alimentaires.

La fonction structurale et modulatrice des lipides membranaires peut donc être dirigée par l'apport alimentaire.

Au-delà de leurs effets énergétiques et structuraux ci-dessus cités, les TAG sont impliqués dans le bon déroulement des fonctions vitales de l'organisme. Ils interviennent dans

les processus de reproduction et de croissance, dans la formation des cellules et dans l'intégrité de la peau. Ils régulent les fonctions rénales, vasculaires et l'agrégation des plaquettes, de même ils interviennent dans les réactions inflammatoires, immunitaires et allergiques.

Il convient donc d'avoir une alimentation équilibrée en respectant les proportions de 25, 15, 60 % d'acides gras saturés (AGS), d'acides gras polyinsaturés (AGPI), d'acides gras monoinsaturés (AGMI).

I.1.2- Les phospholipides

Les phospholipides constituants mineurs des huiles, sont des esters du glycérol dont les positions *Sn*-1 et *Sn*-2 sont occupées par des acides gras et la position *Sn*-3 par l'acide phosphorique lié à un sucre ou à une amine. La double polarité des phospholipides (la partie glycérol-phosphate est hydrophile alors que les acides gras sont hydrophobes) est responsable de leurs activités dans les membranes cellulaires. Ils sont aussi utilisés dans l'agroalimentaire pour ces propriétés émulsifiantes.

I.1.3- Les phytostérols

Les phytostérols (stérols végétaux) sont des métabolites secondaires végétaux qui sont naturellement présents dans les aliments d'origine végétale. Les plus fortes concentrations de phytostérols se trouvent dans les noix et les graines, mais les céréales ainsi que les fruits et les légumes frais et secs en contiennent également. Dans les huiles, ils représentent les composés majoritaires de la fraction insaponifiable.

Ils sont caractérisés par le noyau cyclopentanophénanthréne (Figure I 3) et se distinguent les uns des autres par le nombre et la position de l'insaturation et/ou de la chaîne latérale. Les huiles végétales sont marquées par l'absence du cholestérol ou sa présence en trace. Le stérol dominant dans les plantes est généralement le β -sitostérol, toutefois certaines huiles sont très riches en stigmastérol et en campestérol. Ce sont des molécules reconnues pour leurs effets thérapeutiques.

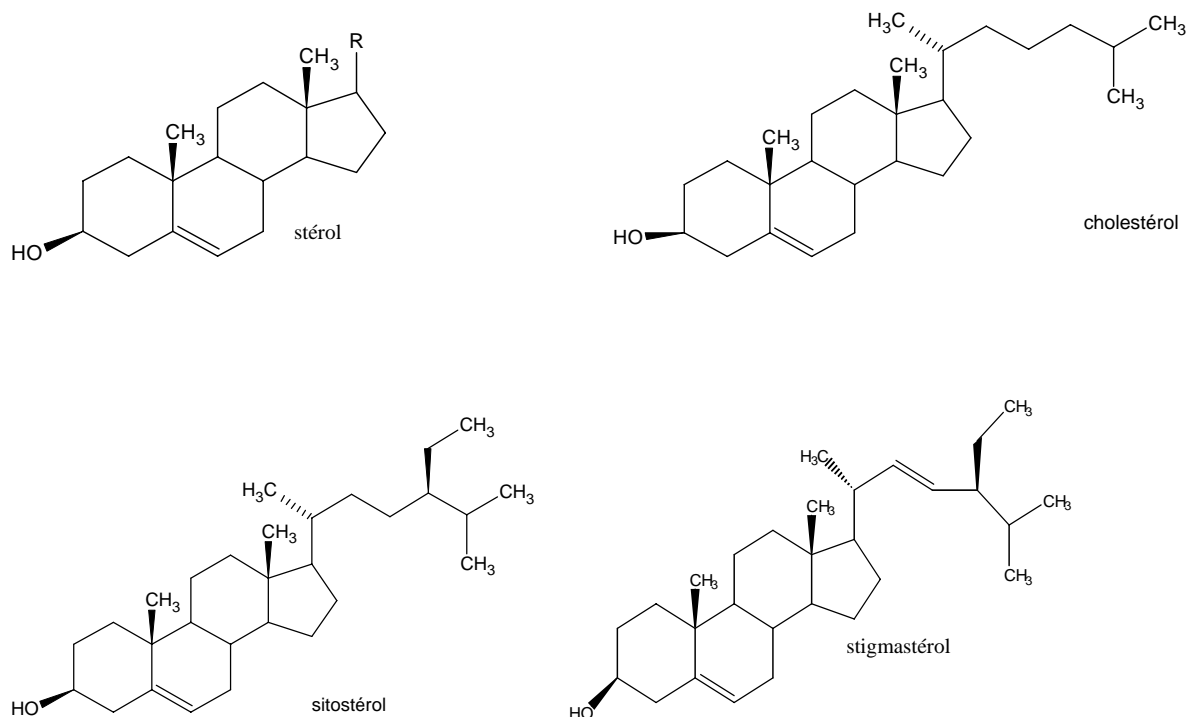


Figure I 3 : Exemples de quelques stérols

Les phytostérols sont utilisés pour faire baisser l'hypercholestérolémie [Law, 2000 ; Jones et *al.*, 1999 ; Plat and Mensink, 2005], l'un des facteurs de risque essentiel des maladies cardiovasculaires .

Différents mécanismes dont celui de la Figure I 4 [Meguro et *al.*, 2001 ; A. de Jong et *al.*, 2003], ont permis d'expliquer cet effet que l'on peut résumer en trois phases:

- Le passage du cholestérol dans le sang au niveau de l'intestin est bloqué car sous l'effet des phytostérols, la paroi intestinale devient infranchissable pour le cholestérol, qui est alors éliminé avec les selles [Child and Kuksis, 1986 ; Salen et *al.*, 1970, Child and Kuksis, 1983 ; Ikeda I and Sugano, 1983].
- Les phytostérols sont plus hydrophobes que le cholestérol, ils peuvent prendre sa place dans les micelles intestinales, qui sont de petits agrégats lipidiques permettant l'absorption des graisses et des substances grasses. Si les micelles sont déjà chargées avec des phytostérols, le cholestérol ne peut plus être absorbé et est éliminé [Plat and Mensink, 2001,].
- Les phytostérols et le cholestérol s'agglutinent tous dans l'intestin, ce qui les empêche de passer dans le sang par la paroi intestinale et, par conséquent, provoque leur élimination.

Suite à l'intensification de l'élimination *via* ces trois mécanismes, la production endogène du cholestérol est nécessaire [Miettinen and Gylling, 1999], le foie produit alors du nouveau cholestérol pour remplir diverses fonctions corporelles (intégration dans les cellules, production d'hormones, production d'acide biliaire).

Cette production étant toutefois insuffisante pour compenser la réduction du cholestérol absorbé à partir de l'intestin, le foie est contraint d'utiliser du cholestérol sanguin, ce qui va se traduire par une baisse du taux de cholestérol [Hallikainen and Uusitupa.,1999; Gylling and Miettinen, 1999; Plat and Mensink, 2000].

Cependant, l'efficacité des phytostérols se trouve renforcée en combinaison avec des médicaments hypocholestérolémiants comme les statines, et les ézétimides [Blair et al. 2000 ; Jakulj and al., 2005].

En plus de ces propriétés hypocholestérolémiantes, les phytostérols empêcheraient le développement de certains cancers. Des travaux sur des rats ont permis de mettre en évidence l'inhibition des activités de la 5- α -réductase et de l'aromatase prostatiques, ce qui supprimerait le métabolisme et l'hypertrophie prostatique [Mettlin, 1997 ; Awad et al. 1998]. De même, les phytostérols agissent sur la croissance des tumeurs en modifiant le cycle de la sphingomyéline [Awad et al, 1996; Hannun and Linardic 1994; Wolff et al. 1994; Leikin and Brenner ,1989].

Néanmoins, les phytostérols, bien que ne présentant pas d'effet nuisible, agissent sur des molécules solubles autres que le cholestérol, tels que les caroténoïdes, les tocophérols et les vitamines transportés aussi par les lipoprotéines [Plat et al., 2000].

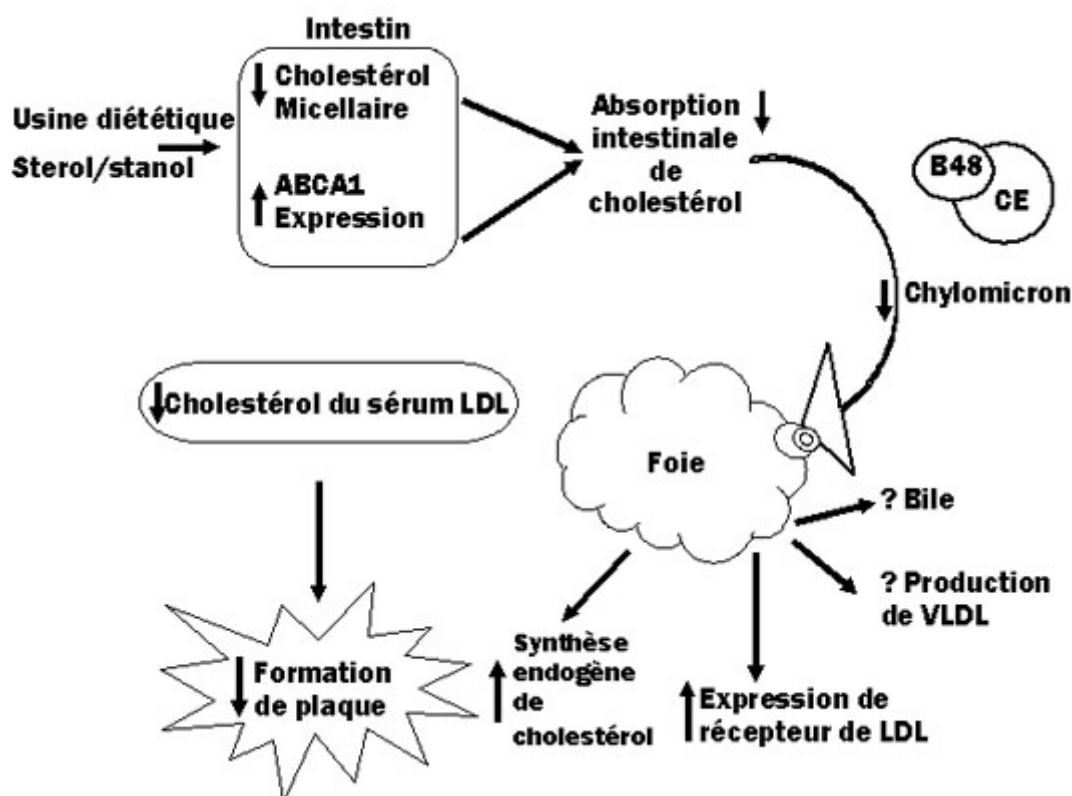


Figure I 4 : Mécanisme d'adsorption des phytostérols dans l'organisme

I.1.4- les tocophérols

La vitamine E est présente dans l'alimentation sous forme de différents tocophérols : l' α -tocophérol, le plus fréquent et le plus réactif biologiquement (il a la meilleure activité vitaminique), le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol. Elle est constituée d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 carbones. Le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau chromanol définissent les différentes formes de tocophérols (Figure I 5).

Insolubles dans l'eau mais très solubles dans les graisses, les tocophérols se présentent sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle à température ambiante. Les tocophérols sont des antioxydants naturels [Rao and Mueller, 1983 ; Saran et *al*, 1983]. Ils interviennent dans la protection des produits organiques et dans les organismes vivants contre l'autoxydation par rupture de la chaîne de réaction au niveau des étapes de propagation et de terminaison.

Dans les huiles, ils permettent de préserver les acides gras insaturés en participant au retardement de l'oxydation.

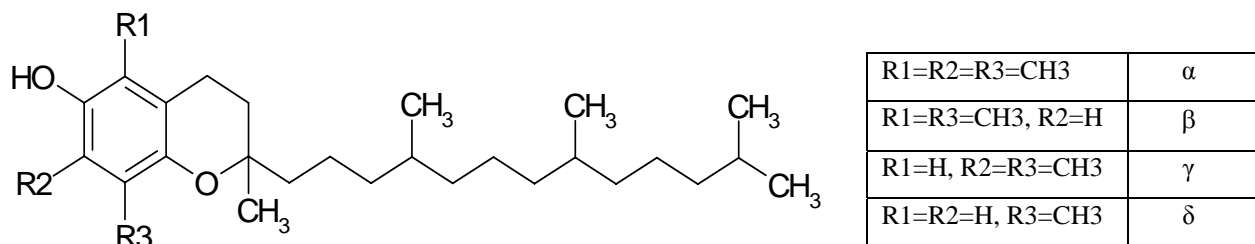


Figure I 5 : structure des différents tocophérols

I.2- Procédés de modifications des huiles végétales

Plusieurs procédés ont été développés pour satisfaire à l'exigence des industries et donner de la valeur ajoutée aux matières grasses. Au nombre de ces procédés on peut citer l'hydrogénation, le fractionnement, l'interestérification chimique et les différentes modifications enzymatiques.

I.2.1- Hydrogénation

L'hydrogénation des matières grasses est un procédé chimique qui consiste à l'addition du dihydrogène sur les doubles liaisons des groupes acyles. Elle permet d'améliorer la résistance à l'oxydation et de modifier le point de fusion de l'huile en réduisant son insaturation. Cette réaction est de grande importance pour l'industrie, car elle permet la conversion des huiles liquides en matières grasses solides pour la production de margarine.

Il s'agit d'une réaction catalytique, le plus souvent à base de nickel hétérogène réduit à sec, cependant un intérêt croissant est porté à l'utilisation des organométalliques servant de catalyseur homogène. La réaction d'hydrogénation peut se résumer à la Figure I 6 (Frankel et Dutton, 1970) où S désigne le substrat (huile), M le catalyseur métallique et H₂ le dihydrogène.

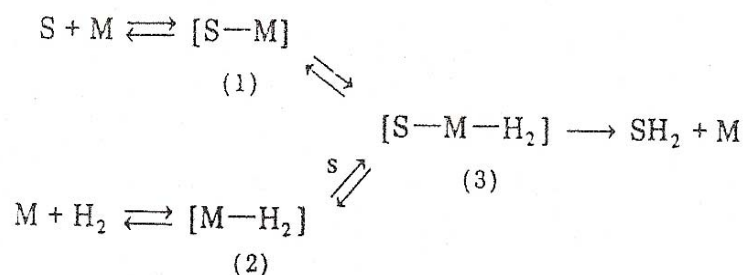


Figure I 6 : Mécanisme de l'hydrogénation catalytique

De nos jours, on assiste plutôt à des réactions d'hydrogénations partielles. L'hydrogénation partielle peut être sélective ou non sélective selon les conditions de réactions. La sélectivité se traduit par l'addition d'hydrogène de préférence sur les acides gras d'insaturation élevée.

La sélectivité de l'hydrogénation augmente avec la température alors qu'elle diminue avec l'augmentation de la pression et de l'agitation du milieu [deMan, 1999].

1.2.2- Interestérification chimique

L'interestérification est le transfert d'un acide gras d'une molécule de triacylglycérols à une autre, ce qui permet industriellement de modifier les propriétés physiques des huiles. Elle est catalysée chimiquement par la soude ou le méthylate de sodium à 80°C pendant 30 à 60 minutes et conduit à une distribution aléatoire (suivant les lois de la probabilité) des acides gras sur les trois positions du glycérol. Ce procédé consomme très peu de catalyseur de 0,05 à 0,1%.

En outre la réaction peut être dirigée ; elle permet ainsi la synthèse de produits plus spécifiques. Dans ce cas précis, elle est conduite à des températures plus douces (20 à 60°C), de telle sorte qu'on assiste à une cristallisation partielle du corps gras. En conséquence, le temps de réaction est plus long et la consommation en catalyseur plus élevée. Le désavantage de l'interestérification chimique concerne surtout les pertes en huile relativement élevées par la production d'esters méthyliques et d'acide gras libres selon la nature de l'interestérification. Des pertes supplémentaires liées à la post-décoloration et à la post-désodorisation sont aussi à prendre en compte (les pertes totales en huile sont de 1,5 % minimum sur base de 0,1 % de catalyseur et 0,5 % de terres de décoloration).

I.2.3- Fractionnement

Le fractionnement est un procédé de séparation d'un composé en ses différents constituants selon leurs propriétés physiques. Le fractionnement s'effectue soit par l'usage d'un solvant, soit par effet de la température en deux étapes que sont : la cristallisation et la séparation.

On peut fractionner de l'huile brute, semi raffinée ou complètement raffinée selon les besoins.

On distingue trois procédés de fractionnement

➤ le fractionnement à sec

Le fractionnement à sec est le procédé de modification le plus employé en raison de son coût et de sa simplicité. Il se déroule en deux étapes que sont : la cristallisation par refroidissement et la séparation des deux fractions solide et liquide sous vide.

La cristallisation s'opère en trois étapes : le refroidissement du mélange, la nucléation et la formation des cristaux.

La qualité de l'huile est un facteur limitant de la cristallisation, la présence des diacylglycérols retarde la nucléation, alors que les cires l'accélèrent et provoquent des malformations des cristaux. Le processus de cristallisation est également entravé par la présence d'impuretés solides, d'eau, de savons, de protéines et de phospholipides.

La séparation s'effectue par filtration soit sous vide ou sur filtre à membranes. Cependant l'efficacité du filtre à membranes plus élevée lui donne la faveur des industries.

➤ le fractionnement par voie humide

est caractérisé par l'ajout, d'une solution de détergent à l'huile partiellement cristallisée.

➤ le fractionnement en présence de solvant.

Le mélange huile solvant est refroidi jusqu'à cristallisation de la fraction désirée. Les cristaux sont séparés par filtration et sont lavés par du solvant refroidi. Bien que ce procédé soit très sélectif, son coût et les problèmes de sécurité liés au solvant limitent son utilisation.

I.2.4- Procédés Enzymatiques

La catalyse enzymatique connaît aujourd'hui avec la maîtrise de l'usage des technologies biologique, génétique et biochimique, un emploi intense et diversifié dans des travaux portant sur la recherche de procédés de plus en plus spécifiques. Les modifications enzymatiques des graisses et des huiles pour la production des triacylglycérols spécifiques sont d'un grand intérêt (Yokozeki et *al.* 1982 ; Macrae and Hammond, 1985) de part la multitude de nouveaux composés produits à haute valeur ajoutée. L'utilisation des enzymes comme biocatalyseur pour la production de triacylglycérols restructurés présente de nombreux avantages en plus de la spécificité des enzymes. On peut citer

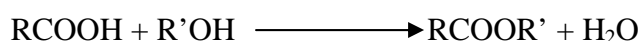
- l'efficacité des lipases dans des conditions douces de réaction,
- la réduction de la pollution environnementale,
- la disponibilité des lipases d'un éventail de sources, et la capacité de leur amélioration par la génétique.
- la synthèse de produits de meilleures qualités nutritionnelles. etc

A cet effet Jean Graille précise *"La méthode enzymatique présente même des avantages économiques car contrairement à l'interestérification chimique, il n'est pas nécessaire de raffiner ni de sécher l'huile au préalable et, de plus, le bioprocédé est mis en œuvre à basse température et permet des économies d'énergie "*.

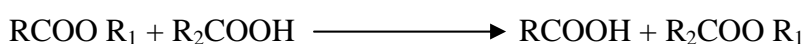
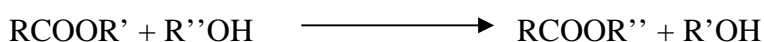
I.2.4.1- Généralités sur les lipases

Les lipases ou glycérol ester hydrolases (EC 3.1.1.3), sont un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols. L'hydrolyse étant réversible, les lipases sont utilisées pour la synthèse de multiples composés à travers les réactions favorisant les transferts acyles comme (Yamane 1987 ; Faber et Riva 1992 ; Villeneuve et Foglia 1997) :

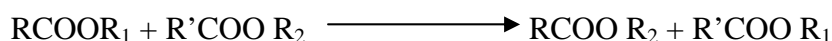
- La synthèse d'esters à partir d'alcools et d'acides gras (estérification)



- Les réactions de transestérification (alcoolyse et acidolyse)



➤ Les réactions d'interestérification



Ainsi, les lipases catalysent la synthèse, esters d'acides gras (Mukesh et al, 2007 ; Yesiloglu, 2004 ; Shimada et al., 2003), d'esters aromatiques (Enaud et al., 2004 ; Manjon et al 1990 ; Langrand et al 1990), les esters de diols connus pour leurs propriétés tensioactives (Berger et al, 1992) et les acylglycérols partiels (Berger et al., 1992 ; Schuch and Mukherjee, 1991 ; Graille 1985 ; El Zant et al., 1988 ; Renard et al., 1990).

Outre ces réactions, les lipases ont permis la synthèse de molécules à haute valeur ajoutée parmi lesquelles, on peut citer des sucroesters (Somashekar et al, 2007 ; Ferrer et al., 2005 ; Plou et al, 2002; Khaled et al,1992; Khaled et al,1991; Seino et al,1984), des amides gras N-substitués (Castillo et al., 2007 ; Jitender et al., 2005 ; Irimescu and Katsuya, 2004; Montet et al.,1989 ; Montet et al.,1990), des acides hydroxamiques gras (Servat et al,1990) et des aminopropanols (Montet et al,1989b).

I.2.4.2- Spécificité des lipases

Elle est généralement déterminée à travers les réactions d'hydrolyse (Vulfon, 1993). Cependant cela est possible dans les réactions de transestérification. Les lipases peuvent être classées en cinq groupes en fonction de leur spécificité dans les réactions d'hydrolyse des triacylglycérols (Villeneuve et Foglia 1997).

✓ **Les lipases non spécifiques**

Ce sont des lipases qui ne présentent aucune affinité vis-à-vis de la nature de l'acide gras du triacylglycérol, ni même de sa position sur la molécule de glycérol. C'est le cas de la lipase de *Candida rugosa*, de *Aspergillus sp* (Fu et al., 1995).

✓ **Les lipases régiosélectives**

La régiosélectivité est l'habilité de la lipase à distinguer les deux positions externes et la position interne du triacylglycérol. On distingue les lipases 1,3 régiosélectives qui hydrolysent préférentiellement les positions *Sn*-1 et *Sn*-3 par rapport à la position *Sn*-2 (Figure I-7)

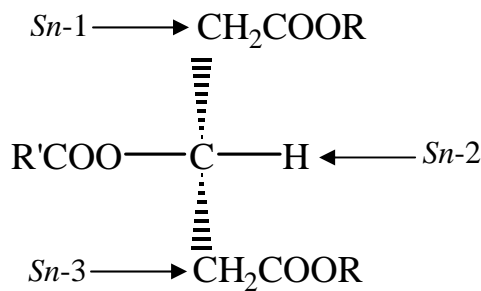


Figure I 7 : Position des acides gras sur les triacylglycérols

✓ Les lipases stéréospécifiques

Cette spécificité est liée à la capacité des lipases à distinguer les positions *Sn*-1 et *Sn*-3 des triacylglycérols. Les travaux de Rogalska et al.(1993) ont montré que la lipase de *Humicola lanuginosa* est *Sn*-1 stéréospécifique alors que celle de *Candida. Antartica B* est *Sn*-3 stéréospécifique.

✓ Les lipases typosélectives

Ce groupe de lipase est spécifique d'un acide gras ou d'une famille d'acide gras. Ainsi, la lipase *Géotrichum candidum* hydrolyse préférentiellement les acides gras comportant une double liaison *cis* en position 9.

✓ Les lipases spécifiques aux substrats

C'est le cas de spécificité, les lipases n'hydrolysent pas les liaisons ester des triacylglycérols mais celles des diacylglycérols, monoacylglycérols ou encore des phospholipides. La spécificité au substrat peut donc être définie comme l'aptitude d'une lipase à hydrolyser des esters de glycérol particulier. Ce type de spécificité est observé pour la lipase de *Penicillium camembertii* qui hydrolyse préférentiellement les liaisons esters de diacylglycérols, et de monoacylglycérols.

I.2.4.3- Origines des lipases

Les lipases sont obtenues par extraction à partir de cellules animales, microbiennes et végétales. Seules les lipases microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion de leurs utilisations. En effet, les importantes acquisitions des connaissances physiologiques et la maîtrise du potentiel génétique des microorganismes ont permis la diversification et la production en masse des lipases microbiennes. Ainsi on peut citer les lipases de *Thermomyces lanuginosa*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Candida rugosa* etc. La Figure I 8 présente la structure tridimensionnelle de la lipase de *Thermomyces lanuginosa*.

Toutefois, bien que récentes, les lipases végétales font aujourd'hui l'objet d'une grande attention dans les synthèses organiques en général et dans la modification des huiles en particulier. L'intérêt accordé à ces lipases réside dans leur application sans aucune purification particulière et du faible coût de leur mise en œuvre en tant que catalyseur.

De récents travaux sur le latex de papaye attestent de la possibilité de ces lipases de concurrencer les lipases microbiennes et d'offrir des horizons plus vastes du fait qu'elles constituent un cocktail d'enzymes (Dhuique-mayer et al., 2003).

Ainsi, on sait aujourd'hui que les protéases extraites de ce latex la chymopapaïne (EC 3.4.22.6) et la papaïne (EC 3.4.22.2), utilisées jadis dans la clarification de la bière (Herbert et al, 1977 ; Fukal et Kas, 1984), dans la production d'hydrolysats protéiques et dans les réactions de synthèses peptidiques (Lozano et al 1996 ; Cantacuzene et al, 1987 ; Morinière et al 1987 ; Taï et al 1989 ; Mitin et al 1997), contiennent des polyphénols oxydases et des lipases.

Plusieurs travaux mettent en évidence l'efficacité des lipases du latex de papaye, dans la synthèse de produits à haute valeur ajoutée.

La connaissance des lipases et notamment leur spécificité en particulier a permis de mettre en œuvre un nombre important de molécules, et en particulier l'obtention de triacylglycérols spécifiques ou restructurés.

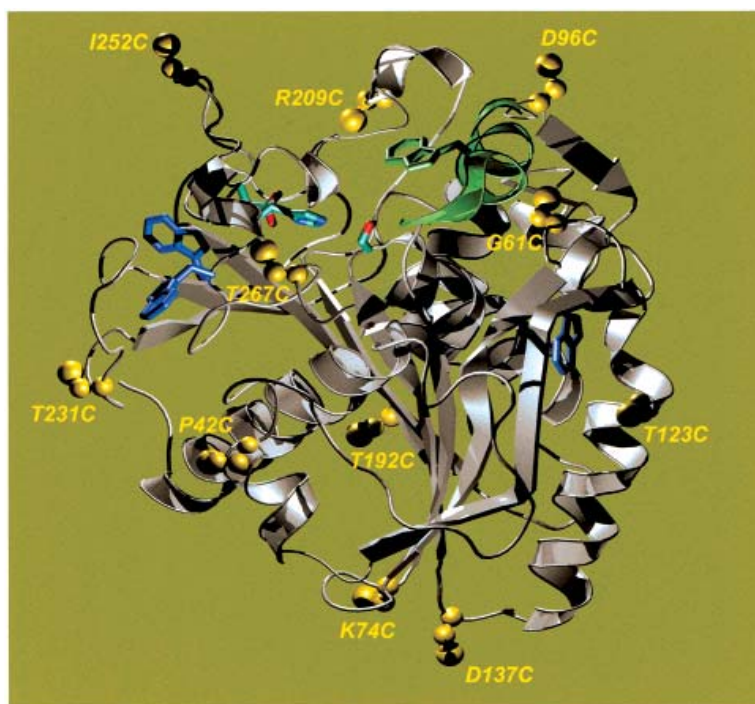


Figure I 8 : Structure tridimensionnelle de la lipase de *Thermomyces lanuginosa*

I.2.4.4- Production des triacylglycérols spécifiques ou restructurés

Les triacylglycérols restructurés sont des triacylglycérols modifiés chimiquement ou enzymatiquement pour changer les acides gras ou changer leur distribution sur le glycérol. La structure moléculaire des triacylglycérols influence leur métabolisme dans l'organisme et leurs caractéristiques physiques ; par conséquent, il est possible d'améliorer les propriétés alimentaires et pharmaceutiques de certains triacylglycérols et ainsi leur devenir dans l'organisme en leur donnant une structure particulière. Sur la base de ces perspectives, les triacylglycérols restructurés ont fait l'objet de beaucoup d'attention.

En effet, la synthèse de triacylglycérols de structure particulière exige le déplacement de certains acides gras aux positions désirées sur le glycérol. Bien que la catalyse chimique soit simple et peu coûteuse la nature aléatoire de son mécanisme limite son utilisation. En revanche, la spécificité des lipases fait de la catalyse enzymatique un outil adapté et indispensable.

La synthèse enzymatique de triacylglycérols restructurés repose généralement sur les réactions d'interestérification, d'acidolyse et de transestérification catalysées par des lipases *Sn-1,3* sélectives.

I.2.4.4.1- Les triacylglycérols à chaîne moyenne (MLM)

Ce sont les lipides restructurés, dans lesquels les acides gras (principalement insaturés) à longue chaîne sont en position *Sn*-2 du glycérol tandis que les acides gras à moyenne chaîne (C6 :0 à C12 :0) sont dans les positions *Sn*-1 et 3. Ce sont des TAG dans lesquels on associe la mobilité, la solubilité et la rapide biodisponibilité des acides gras à chaîne moyenne et les propriétés thérapeutiques des acides gras polyinsaturés (Cater et *al.*, 1997 ; Akoh, 1998) ; ainsi on augmente la biodisponibilité des acides gras polyinsaturés qui sont directement disponibles après incorporation dans les lipoprotéines. Ils sont utilisés dans certains cas d'insuffisance pancréatique (mucoviscidose, pancréatite chronique)[Hey et *al.*, 1998; Bell and Bistran, 1998] et existent dans le commerce sous des noms comme salatrim, caprenin, captex etc.

Plusieurs travaux ont permis la synthèse de ces molécules par des réactions d'acidolyse ou d'interestérification selon la Figure I 9.

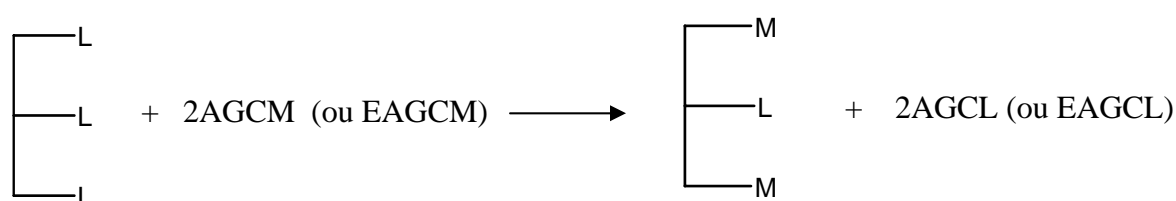


Figure I 9 : synthèse des triacylglycérols (MLM) en une étape

Ainsi Jennings et Akoh (1999; 2001) ont effectué la synthèse de triacylglycérols à moyenne chaîne enrichie à l'EPA et au DHA par l'acidolyse de l'huile de poisson par l'incorporation de l'acide caprylique. Fomuso et Akoh (2002) ont étudié l'incorporation par la lipase de *Rhizomucor miehei* de l'acide caprylique dans l'huile d'olive avec un ratio 5/1. Cette étude a permis d'incorporer 43 % d'acide caprylique dans l'huile d'olive majoritairement en position externe, l'acide oléique restant en position interne. Dans les conditions de réactions précédentes, Lai et *al.* (2005) incorporent 30,5% d'acide caprylique dans l'oléine de palme. Tandis que Wakako (2005) a étudié l'acidolyse entre la trioléine et les acides gras à courte chaîne (C2 :0 ; C3 :0 ; C4 :0) en milieu organique, Villeneuve et al (2007) ont produit des triacylglycérols à moyenne chaîne enrichis à l'acide linoléique conjugué en position *Sn*-2 en utilisant deux lipases dont l'une est végétale.

Toutefois, il est à noter la présence de produits indésirables et un faible rendement de réaction. Pour pallier ces inconvénients, Soumanou et *al.* (1997,1998a, 1998b) ont obtenu

des produits purs avec un rendement meilleur en utilisant une réaction à deux étapes (alcoololyse- acidolyse) en passant par un intermédiaire monoglycéridique selon la Figure I 10.

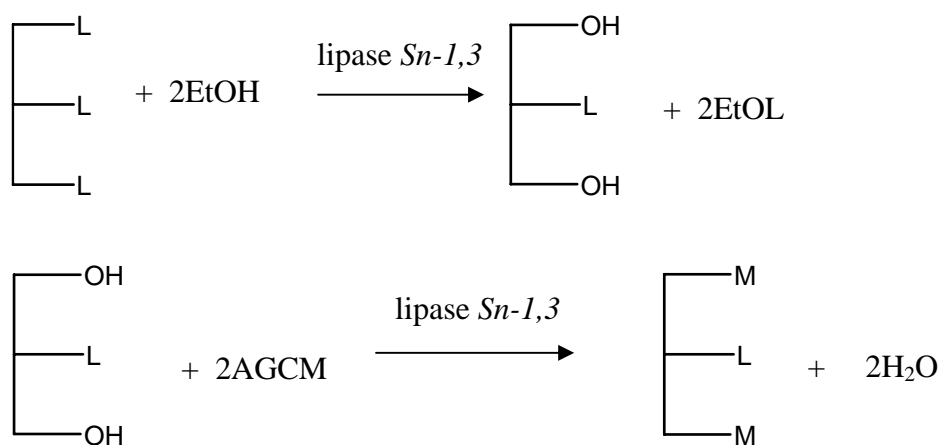


Figure I 10 : synthèse des triacylgcérols (MLM) en deux étapes

Cette méthode appliquée à certains triacylgcérols en C18 insaturés (trioléine trilinoléine ou huile d'arachide), a permis d'obtenir 72% de monoglycéride après cristallisation dans l'hexane et l'acylation par l'acide caprylique conduit à la synthèse d'un triacylgcérol composé à 94% d'acide caprylique en position Sn-1 et Sn-3 et 98% des acides en C18 insaturés en position centrale (Sn-2).

I.2.4.4.2- Les équivalents de Beurre de Cacao

Le beurre de cacao est une des matières premières indispensables dans l'industrie du chocolat et des produits de confiserie.

Pour des raisons économiques, les nouvelles directives de la commission européenne, permettent de remplacer 5% de beurre de cacao par de la matière grasse végétale.

En raison des différences fonctionnelles des matières grasses végétales ajoutées au beurre de cacao, Brinkmann (1992) et Bouscholte (1994) cités par Lipp et Anklam (1998) les classent en trois groupes

- Les équivalents de beurre de cacao : compatibles en tout point avec le beurre de cacao (composition chimique et propriétés physiques) et pouvant être en des proportions très élevées ; ce sont des huiles non lauriques (ne contenant pas l'acide laurique).

- Les substituts de beurre de cacao : ce sont des huiles lauriques chimiquement différentes mais avec des propriétés physiques similaires et pouvant remplacer le beurre de cacao en totalité ;
- Le troisième groupe traité de « cacao butter replacer » en anglais, tout comme les équivalents de beurre de cacao sont des huiles non lauriques ayant une composition en acides gras similaires mais avec une composition en triacylglycérols différente. Ils sont miscibles en très faibles quantités avec le beurre de cacao.

La synthèse d'équivalent de beurre de cacao a fait l'objet de nombreux travaux et différentes méthodes ont été utilisées. Ainsi, les composés majoritaires du beurre de cacao ont été obtenus par interestérification chimique d'un mélange de différentes matières grasses dont du beurre de karité fractionné et de l'huile de palme fractionné (Tanaka *et al*, 1987). Ronald et Bexley (1961), par fractionnement de l'huile de palme à l'acétone, ont produit un substitut de beurre de cacao. Aujourd'hui, les synthèses enzymatiques par des lipases Sn-1,3 spécifiques font l'objet de toutes les attentions avec des substrats très variés, notamment à partir d'huile de palme [Bloomer *et al*, 1990; Sridhar *et al*, 1991 ; Chang et Abraham, 1990 ; Chong *et al*, 1992 ; Mojovic *et al*, 1993, Undurraga *et al*, 2001, Wang *et al*. 2006].

II-Généralités sur le *P. butyracea* Sabine

II.1- Description Botanique du *P. butyracea*

Le *P. butyracea* Sabine (arbre à beurre, arbre à chandelle, arbre à suif) est un arbre de la famille des clusiacées à fût cylindrique, droit sans contrefort et d'une hauteur de 10 à 25 mètres (Figure I 11). C'est un arbre à latex jaune, à fleurs charnues crèmes ou blanches, avec des sépales persistantes, atteignant 15x10 cm de dimensions. La fleur (Figure I 12) peut contenir 3 à 10 graines dans une pulpe jaune (Figure I 13). La période de fructification du *P. butyracea* s'étend d'avril à juin au Bénin (Natta, 2003; Sinsin et Sinadouwirou, 2003).



Figure I 11 :
P. butyracea



Figure I 12 :
fruits du *P. butyracea*

Mais certains auteurs, comme Baumer 1995 affirme qu'elle a lieu entre janvier et octobre suivant les régions et les variétés non encore isolées tandis que Houngbédji (1997) distingue deux périodes de fructifications d'avril à mai et d'octobre à décembre.

Les amandes fraîches de *P. butyracea* sont consommées comme les noix de cola (Adomako, 1977) et ont été longtemps frauduleusement mélangées aux noix de cola en Sierra Leone (Sinsin et Sinadouwirou 2003, Baumer 1995).

Le *P. butyracea* est une espèce des forêts denses, son aire de distribution s'étend de la Sierra Leone à la République Démocratique du Congo (Bamps, 1971 ; Aubreville, 1950 ; Vivien & Faure, 1985).

Au Bénin, le *P. butyracea* est une espèce des galeries forestières et des berges des cours d'eau dans les savanes du nord et du centre. Les travaux de Natta (2003) ont permis de définir les zones de présence du *P. butyracea* au Bénin. (Voir carte de répartition du *P. butyracea* au Bénin (Figure I 14)) et d'étudier les facteurs écologiques déterminant sa présence.



Figure I 13 :
Graine de *P. butyracea*

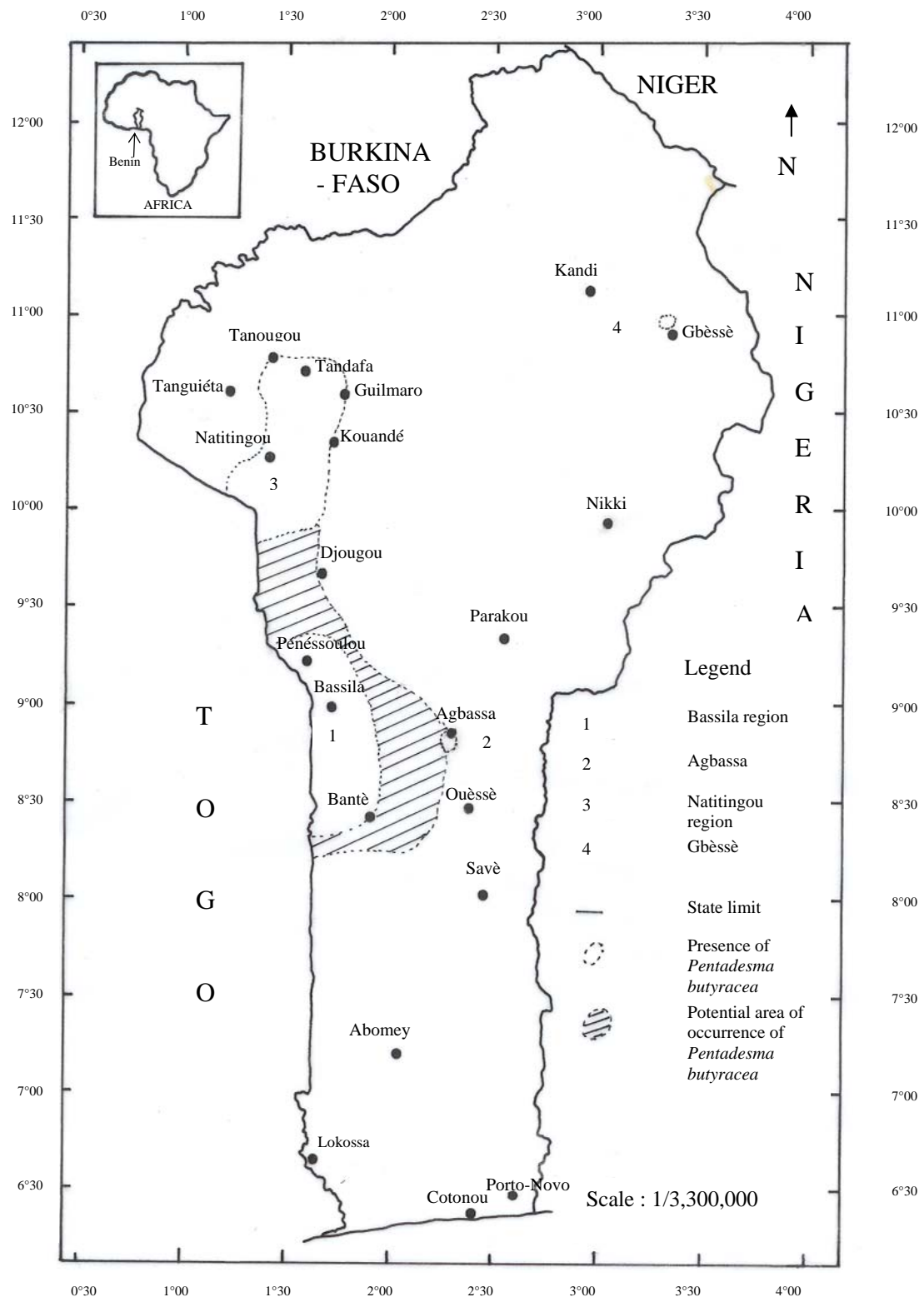


Figure I 14 : Carte de localisation du *P. butyracea* au Bénin (Natta, 2003)

II-2 Extraction du beurre de *P. butyracea* en milieu Paysan

L'extraction du beurre de *P. butyracea* dans les villages est une activité réservée aux femmes. Il n'existe pas une méthode unique pour l'extraction du beurre mais plusieurs procédés qui se résument aux opérations suivantes :

Ramassage : il consiste à la collecte du fruit avec ou sans pulpe ; cette opération est suivie de l'étalage des graines dépulpées (Figure I 15) au soleil pour réduire la teneur en eau ; puis elles sont stockées avant décorticage. Pour conserver les graines il est d'usage d'effectuer une opération technologique.

Les graines dépulpées sont précuites dans de l'eau bouillante puis séchées. Cette opération a pour but d'inactiver les enzymes endogènes et bactériennes pour garder au beurre ses qualités premières.

Torréfaction : elle consiste à griller les amandes dans une marmite pour leurs donner un aspect huileux et rehausser le goût des amandes ; cette phase est précédée du concassage des amandes.

Laminage : il permet d'obtenir à l'aide de deux pierres une pâte très fine. Cette tâche est effectuée par plusieurs femmes. Généralement les amandes concassées sont pilées avant le laminage.

Barattage : c'est l'opération qui consiste à malaxer la pâte d'amande dans de l'eau tiède entre les doigts jusqu'à obtenir un surnageant de beurre. Le beurre recueilli est lavé à l'eau froide.

Cuisson : elle est effectuée dans de l'eau bouillante ; elle permet de précipiter les impuretés par décantation et d'éliminer les gommages sous forme de mousse. Enfin on recueille le beurre (Figure I 16).



Figure I 15 : Etalage des graines dépulpées de *P. Butyracea*

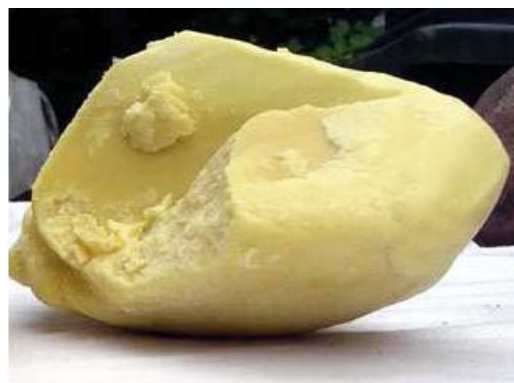


Figure I 16: Beurre de *P. Butyracea*

II.3- Travaux antérieurs sur la graine de *P. butyracea*

Les amandes de *P. butyracea* renferment un taux élevé de matière grasse. Les études réalisées par Adomako (1977), Kouadio et al (1990) et Dencausse et al (1995), ont permis de déterminer quelques caractéristiques physiques et physico-chimiques, la composition en acides gras, en stérols, et en alcools triterpéniques du beurre de *P. butyracea*.

Le beurre présente une plage de cristallisation identique à celle du beurre de karité et du Beurre de Cacao, mais une plage de fusion et un point de glisse supérieurs à ceux des autres. Il renferme une composition en acides gras marquée par la présence de deux acides gras (acide stéarique et oléique) largement majoritaire comptant pour près de 95% des acides gras totaux. De cette composition en acide gras et en faisant un parallèle avec la composition en acides gras du beurre de karité et son profil triglycéridique, Adomako (1977) suggéra que le profil triglycéridique du *P. butyracea* serait constitué à 90% de stéaryldioléine et oléylidistéarine.

Les insaponifiables représentent environ 1,5 % de la teneur en huile ; ils contiennent dans la fraction stérolique des Δ^5 et Δ^7 stérols. Le stérol majoritaire est le stigmastérol (45%), alors que le β -sistostérol représente moins de 5% des stérols totaux, ce qui est assez rare chez les trachéophytes. Quant à la composition en alcools triterpéniques, elle présente une similarité avec le beurre de karité, les composés majeurs étant le butyrospermol (22%), la β -amyrine (10%), l' α -amyrine (39,7%), le lupéol (20,0%).

L'étude de l'éventuelle substitution du beurre de cacao à celui de *P. butyracea* dans des proportions définies a permis à Adomako (1977) de montrer que le beurre de *P. butyracea* à faible concentration dans le beurre de cacao (ratio 1/ 3) ne modifiait pas ses caractéristiques physiques.

Kouadio et al (1990) s'intéressant au potentiel nutritionnel de la graine de *P. butyracea* ont aussi étudié les tourteaux délipidés. Des résultats obtenus, il ressort que les tourteaux sont pauvres en éléments minéraux (0,64 % de MS), en protéine (4,5 % de MS) et en cellulose (5,57 % de MS), tandis qu'ils sont très riches en glucide (44,84% de MS).

II.4- Utilisation du *P. butyracea* Sabine

Le *P. butyracea* est un arbre à but multiple, exploité dans son intégralité. Mais les principales utilisations sont néanmoins issues du beurre extrait des amandes du fruit.

La plus grande part de la production de beurre de *P. butyracea* est autoconsommée car il s'agit d'une des principales sources de matière grasse dans la plupart des régions où il est trouvé en quantité significative (Sinsin et Sinadouwirou 2003). L'alimentation est l'utilisation la plus importante quoique concurrencée par les soins cutanés. Le beurre de *P. butyracea* est le substitut du beurre de karité, lorsque les noix de karité se font rares ou qu'il est interdit de les consommer (les femmes peuls ne sont pas autorisées à consommer le beurre de karité après l'accouchement jusqu'au moment où leurs enfants marchent ou rampent) (Schreckenbergs 1996).

En cosmétique, le beurre de *P. butyracea* constitue une ressource essentielle, car il est un produit de toilette aussi bien des femmes que des hommes. Il est également étendu sur tout le corps après la toilette afin de délasser les muscles et d'adoucir la peau surtout pendant la saison sèche où la peau a tendance à se déshydrater. Il sert de baume dont les femmes s'enduisent les cheveux. C'est une bonne matière première pour la fabrication du savon mais qui pourrait provoquer des démangeaisons (Sinsin et Sinadouwirou 2003). La pharmacopée traditionnelle a recours au beurre de *P. butyracea* pour ses propriétés antalgiques dans le traitement des maux de côtes et comme une huile de massage dans le traitement des toux chez les enfants.

Au Ghana, le beurre de *P. butyracea* est utilisé dans la fabrication des margarines et pour l'éclairage (en le faisant brûler, il remplace la bougie) (Natta, 2003 ; Abbiw, 1990). Quant aux autres parties de la plante, les feuilles seraient de bons lactogènes pour les nourrices et rendraient le lait pour l'allaitement plus digeste. Ce lait confèrerait une bonne dentition à l'enfant (Sinsin et Sinadouwirou, 2003). Une infusion des écorces aurait des propriétés antipyrétiques lorsqu'on se lave avec cette préparation. L'infusion des racines est utilisée pour laver les enfants lors du sevrage.

La décoction des racines possède des propriétés antihelminthiques et celle des écorces soigne de la diarrhée et de la dysenterie (Natta, 2003 ; Abbiw, 1990). Les jeunes branches servent de brosses à dents végétales pour les populations dans la région de Natitingou (nord Bénin) (Sinsin et Sinadouwirou, 2003).

Par ailleurs, les extraits de feuilles et d'écorces du *P. butyracea* ont une action biologique du type pesticide, d'après un test réalisé sur les crevettes saumures (Tuani *et al.*, 1994).

Le *P. butyracea* fournit des planches et des charpentes de bonne qualité mécanique (Purba and Sumarua, 1987 ; Rachman and Balfas, 1987 ; Tuani *et al.*, 1994).

II.5- Commercialisation du beurre de *P. butyracea*

Le beurre de *P. butyracea* malgré ses multiples utilisations ne connaît pas une commercialisation aussi importante que le beurre de Karité. Il existe néanmoins un marché d'écoulement du beurre en tant que beurre de Karité jaune ou beurre de Kpangnan (nom en langue locale du nord Bénin et nord Togo).

Au Bénin et principalement dans la localité de Bassila, tandis que la vente des amandes est locale, celle du beurre est transfrontalière (Figure I 17)

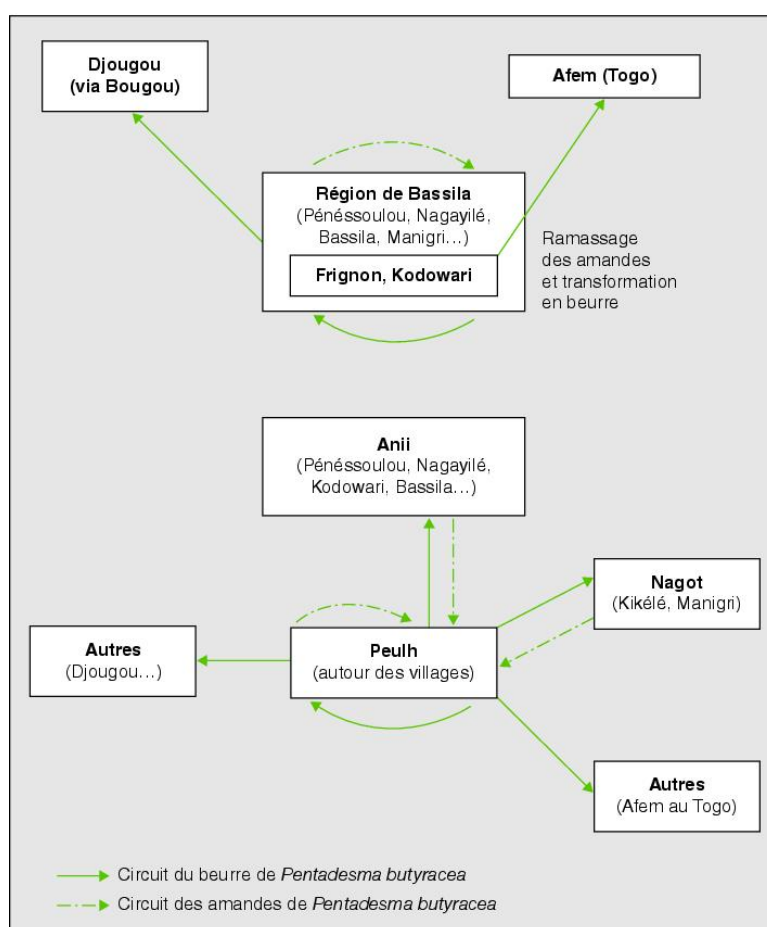


Figure I 17 : Circuit de commercialisation des amandes et du Beurre de *P. butyracea* dans la région de Bassila (Sinsin et Sinadouwirou, 2003)

I- Matériels

Le matériel végétal est constitué des amandes séchées de même état de maturité de *P. butyracea* Sabine (2 kilogrammes) ramassées sous les arbres dans dix localités du Bénin (Figure II 1 et Tableau II 1).

Les différentes coordonnées des points de récoltes déterminées par GPS sont données dans le Tableau II 1 de même que les traitements appliqués aux différentes graines.

Les amandes sont moulues à l'aide d'une meule mécanique et de la poudre obtenue est extrait le beurre à l'hexane.

Pour une étude comparative, des échantillons de beurre de cacao et de karité sont aussi étudiés. Le beurre de cacao (BC) nous a été fourni par le département des cultures pérennes du CIRAD et est enregistré sous le numéro beurre de cacao VALRHONA lot 12-2003/L0907. Le beurre de karité (BK) est extrait des graines de karité récolté au Bénin (Natitingou) à l'aide de hexane.

Les lipases microbiennes (*Thermomyces lanuginosa* et *Candida antarctica*) sont des produits de la compagnie sigma. Pour les lipases végétales, une préparation de papaïne commerciale (compagnie sigma) et une préparation de latex lyophilisé d'origine béninoise ont été utilisées.

Les solvants utilisés sont de pureté analytique, à l'exception de ceux utilisés pour HPLC qui sont des solvants pour HPLC (Merck S.A.). Les réactifs sont des produits Sigma.

Tableau II 1 : site de collecte, localisation et prétraitement des graines de *P. butyracea*

Site de récolte	Commune	ID	Traitement	Coordonnées UTM	
				X (m)	Y (m)
PREKETE	BASSILA	BP 1	Etuve 80 °C	349207	958900
AGBASSA	TCHAOUROU	BP 2	Etuve 80 °C	419443	971241
PENELAN	BASSILA	BP 3	Etuve 80 °C	336366	1021026
PENESSOULOU	BASSILA	BP 4	Etuve 80 °C	340815	1021283
WANNOU	BASSILA	BP 5	Etuve 80 °C	370082	993447
BASSILA 1 (N)	BASSILA	BP 6	Séchage solaire	352306	995633
PENELAN (GB)	BASSILA	BP 7	Graines bouillies	336366	1021026
BASSILA1	BASSILA	BP 8	Etuve 80 °C	352306	995633
MANIGRI	BASSILA	BP 9	Etuve 80 °C	361298	992009
BASSILA 2	BASSILA	BP 10	Etuve 80 °C	350366	994096
PEPERKOU	TOUCOUNTOUNA	BP 11	Etuve 80 °C	330522	1153563
PEPERKOU (N)	TOUCOUNTOUNA	BP 12	Séchage solaire	330522	1153563
NATITINGOU	NATITINGOU	BP 13	Etuve 80 °C	321017	113780

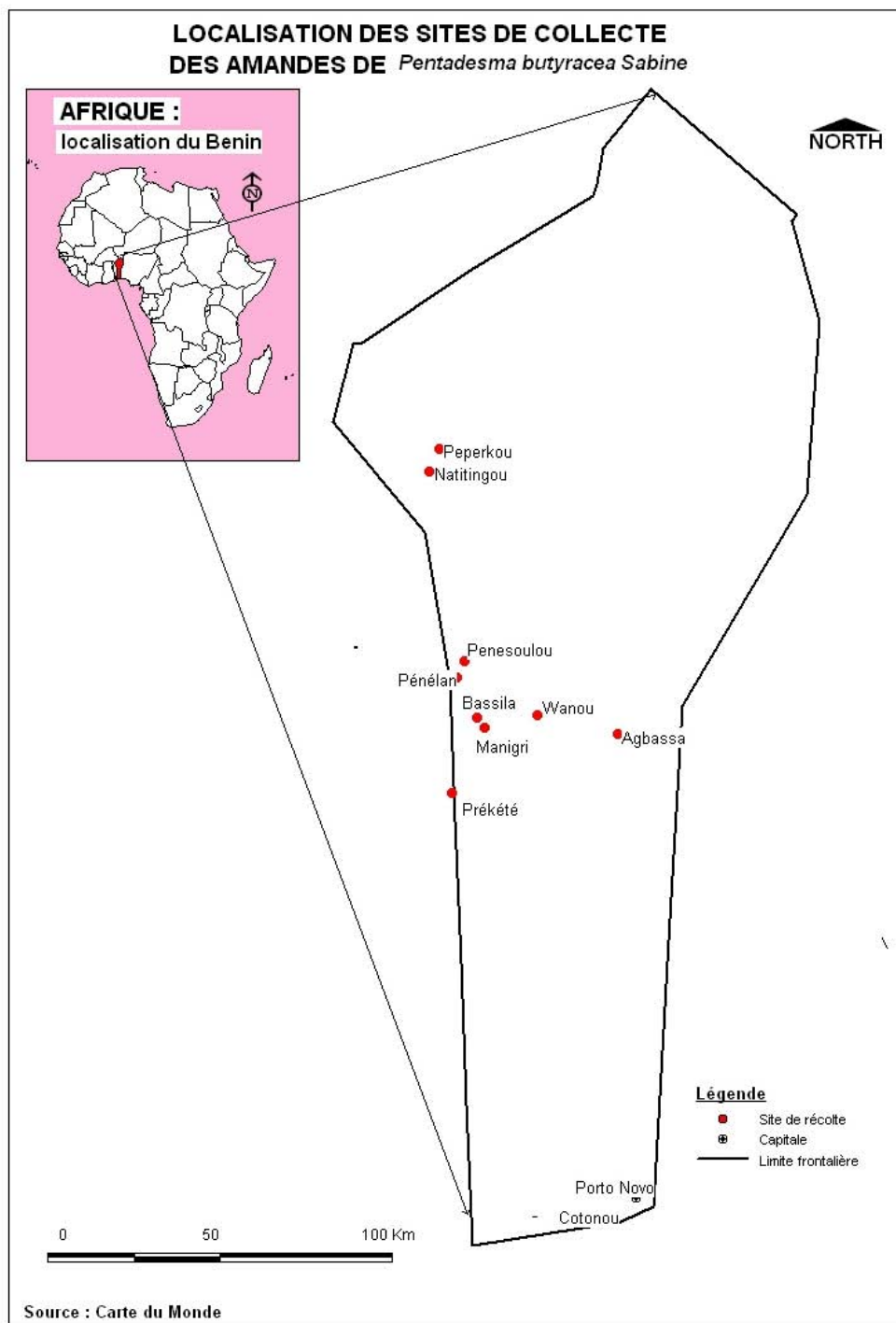


Figure II 1 : Localisation des sites de collecte des amandes de *P. butyracea* au Bénin

II- Méthodes

II.1- Extraction et caractérisations des Beurres

II.1.1 Teneur en eau et matières volatiles (T_E) norme ISO-665 (F)

La détermination de la teneur en eau et matières volatiles consiste à mesurer la perte en masse d'un échantillon par dessiccation à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ dans une étuve à la pression atmosphérique

Des creusets en aluminium tarés (P_1) contenant des prises d'essai (P_E) de 5g d'amandes sont séchés pendant 1heure dans une étuve réglée à $103 \pm 2^\circ\text{C}$. On laisse refroidir dans un dessiccateur jusqu'à température ambiante puis on pèse sur la même balance analytique au 1/10 de mg. Les opérations de chauffage (30 minutes dans l'étuve), de refroidissement et de pesée sont répétées jusqu'à ce que la perte de masse entre deux pesées (P_2) soit inférieure à 2mg

$$T_E = \frac{((P_1 - P_E) - P_2)}{P_E}$$

II.1.2- Extraction au Soxhlet et teneur en matière grasse (TMG)

L'appareil à extraction Soxhlet se compose d'un ballon, d'un extracteur avec une cartouche à extraction pour les substances solides et d'un réfrigérant à reflux (Figure II 2). En chauffant le ballon, le solvant se vaporise dans l'extracteur puis les vapeurs se condensent dans le réfrigérant. Le solvant condensé proche de sa température d'ébullition, tombe goutte à goutte sur la poudre d'amande dans la cartouche où il s'accumule. Quand le niveau de siphonage est atteint, le volume contenant le solvant condensé et les produits d'extraction est siphonné et recueilli dans le ballon. Le processus se répète automatiquement jusqu'à épuisement des matières lipidiques contenues dans l'échantillon.

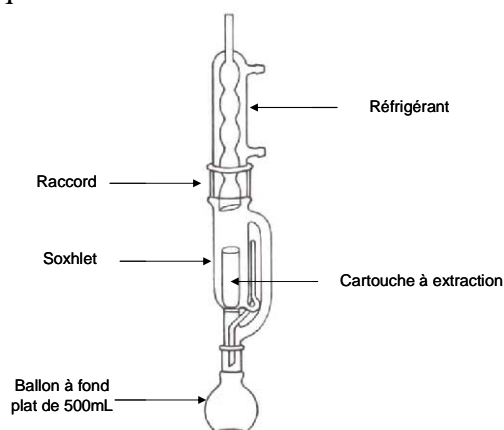


Figure II 2: Schéma de l'extracteur au Soxhlet

Mode opératoire

5 g d'amande moulue (P_E) et séchée sont introduites dans une cartouche et le beurre est extrait à l'hexane. L'extraction est faite en continu pendant 7 heures. Le beurre est récupéré dans le ballon préalablement taré (P_1) après évaporation de l'hexane sous vide à l'évaporateur rotatif et passage sous un courant d'azote. Le ballon est placé à l'étuve pendant 30 minutes et pesé après refroidissement dans un dessiccateur (P_2).

Les masses sont exprimées en grammes

$$TMG = \frac{P_2 - P_1}{P_E} \times 100$$

II.1.3- Mesure de l'acidité des beurres (Norme française NF T60-204)

L'acidité d'un corps gras mesure le pourcentage d'acides gras libres contenu dans celui-ci. Les corps gras sont mis en solution dans un mélange de solvants ; les acides gras libres sont titrés à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine.

On introduit 2 g de corps gras dans environ 40 ml d'un mélange oxyde diéthylique/éthanol (v:v) avec 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine. Le mélange est titré avec une solution d'hydroxyde de sodium (0,1 N) et agité avec un agitateur magnétique jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose persistante pendant 10 secondes au moins).

L'acidité Ia est exprimée par l'équation suivante et s'exprime en % d'acide oléique :

$$Ia = \frac{(V - V_o) \times N \times M}{10 \times m}$$

V_o : volume de l'essai à blanc

V : volume de NaOH nécessaire à la neutralisation

N : normalité de la solution d'hydroxyde de potassium

M : masse molaire en g/mol de l'acide oléique

m : prise d'essai en grammes

II.1.4- Détermination de la teneur en insaponifiable (NF T 60-205-2)

Les matières insaponifiables sont les composés non glycéridiques des matières grasses. L'évaluation de la teneur en insaponifiable s'effectue par saponification du corps gras par traitement à l'ébullition à reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium et par extraction à l'hexane. L'insaponifiable est séparé de la solution de savon par lavage à l'hexane

5g de beurre (P_E) sont portés à ébullition à reflux avec 50 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (1 mol/L) pendant une heure. Après arrêt du chauffage et ajout de 50 mL d'eau par le haut du réfrigérant, l'ensemble est lavé dans une ampoule à décanter avec 50 mL d'hexane (cette opération est répétée 3 fois de suite). L'ensemble des extraits hexaniques est lavé trois fois avec des fractions de 25 mL de solution d'éthanol (10% V/V). La phase hexanique récupérée dans un ballon taré (P_0), est évaporée par un évaporateur rotatif à 45 °C. Le résidu est séché pendant 15 minutes à l'étuve, puis refroidi au dessiccateur et pesé à 0,1mg près. Cette dernière opération est répétée jusqu'à ce que la perte de masse entre deux pesées successives soit inférieure à 2 mg (P_1).

Un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions et la masse de résidu est pesée (P_2)

Le pourcentage en insaponifiable T_{ins} est donné par la relation

$$T_{ins} = \frac{100(P_1 - (P_0 + P_2))}{P_E}$$

II.1.5- Composition en acides gras

L'analyse des acides gras nécessite leur transformation en esters méthyliques. Ce procédé a pour but de masquer la polarité des fonctions carboxyliques et de rendre les solutés volatiles; les esters sont alors séparés sur la colonne chromatographique en fonction des différences de polarité liées aux longueurs de chaînes. Deux étapes sont nécessaires pour la transformation des corps gras en esters méthyliques.

Méthanolyse basique : elle permet de transformer en esters méthyliques les triacylglycérols neutres et en savons les acides gras libres.

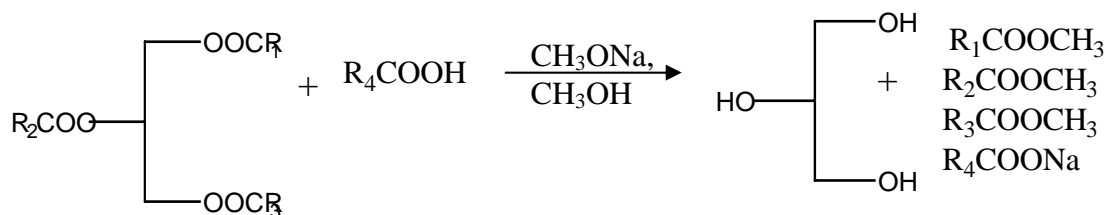


Figure II 3 : Equation de la méthanolyse alcaline par le méthylate de sodium.

Estérification acide : Les savons précédemment formés sont estérifiés par acidification du milieu dû à un excès de méthanol chlorhydrique.

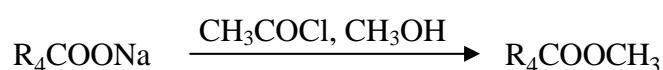


Figure II 4 : Equation de l'estérification des acides gras en présence de méthanol chlorhydrique

II.1.5.1- Préparation des réactifs

Solution de méthylate de sodium

Une solution de méthylate de sodium est préparée en mélangeant 62 mL d'une solution de méthylate de sodium à 0,5 M dans du méthanol, 560 mL de méthanol pour HPLC et une pointe de phénolphthaléine.

Solution de méthanol chlorhydrique

Cette solution est préparée sous hotte aspirante en versant goutte à goutte 50 mL de chlorure d'acétyle dans 625 mL de méthanol pour HPLC sous agitation modérée.

II.1.5.2- Préparations des esters méthyliques des acides gras

Les esters méthyliques des échantillons sont préparés par trans-estérification avec du méthylate de sodium selon la norme NF T60-233. Dans un ballon de 25 mL, on introduit 10 mg de matières grasses auxquels sont ajoutés 3 mL de solution de méthylate de sodium

contenant la phénolphthaléine. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 10 minutes. Puis on ajoute 3 mL d'une solution méthanolique de HCl jusqu'à la décoloration de phénolphthaléine. Le mélange ainsi obtenu est à nouveau chauffé à reflux pendant 10 minutes et refroidi à température ambiante. Après ajout de 8 mL d'hexane et de 10 mL d'eau, la phase organique récupérée est ensuite séchée avec le sulfate de sodium anhydre et filtrée pour l'analyse chromatographique.

II.1.5.3- Analyse Chromatographique des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques (contenus dans la phase hexanique récupérée ci-dessus) sont analysés au moyen d'un chromatographe Agilent 6890 series. Le chromatographe est équipé :

- d'un four programmable en température.
- d'une colonne capillaire moyennement polaire supelcowax10 {L= 30m; D= 0.32µm; ; e = 0.25 µm Phase stationnaire ; poly éthylène glycol. }.
- d'un injecteur Split (rapport de fuite : 1/80)
- d'un détecteur à ionisation de flamme.

Les températures du détecteur et de l'injecteur sont respectivement de 250 et 270°C, et celle du four est programmée de 150°C à 225°C avec un gradient de 5°C/min. Le gaz vecteur est de l'Hélium avec un débit dans la colonne de 1 millilitre par minute. L'identification des esters méthyliques est faite par comparaison des temps de rétention avec les esters méthyliques de témoin préalablement analysés.

II.1.6-Détermination de la répartition des acides gras des triacylglycérols des différents beurres de *P. butyracea*

Les triacylglycérols sont obtenus par chromatographie sur colonne d'oxyde d'alumine par élution à l'hexane. La composition en acides gras des triacylglycérols est déterminée par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras des triacylglycérols. La détermination de la composition en acides gras en position interne et externe nécessite une hydrolyse enzymatique des triacylglycérols par la lipase pancréatique de porc permettant la détermination directe des acides estérifiant la position 2 du glycérol (Norme ISO 6800).

Après purification sur colonne d'alumine, 0,1 g de triacylglycérol est dissous dans 0,2 mL d'hexane, puis après un ajout de 20mg de lipase pancréatique de porc et de 2 mL de

solution de tampon tris pH=8,0, le mélange est agité soigneusement. On ajoute ensuite 0,5 ml de cholate de sodium 1 g/L et 0,2 mL de chlorure de calcium à 220 g/L. Les différents réactifs sont agités 1 minute à 40°C, puis 2 minutes à température ambiante au Vortex, l'hydrolyse enzymatique est arrêtée par addition de 1 mL de HCl (6 M). Les produits d'hydrolyse sont extraits par 2 fois avec 2 mL d'éther éthylique, et ensuite séparés par chromatographie sur couche mince de plaque de silice (feuilles de Verre recouvertes de gel de silice 60, 0,25 µm d'épaisseur, Alltech). Le solvant de développement est un mélange hexane/éther diéthylique/Acide acétique (70 : 30 : 1 ; v/v/v). Un dépôt témoin de monooléine ($R_f = 0,035$) est effectué sur la plaque afin de repérer la bande des monoglycérides (Figure II- 5). Après révélation, la bande des monoglycérides est grattée et utilisée telle quelle pour préparer les esters méthyliques qui seront analysés par chromatographie en phase gazeuse comme décrit précédemment. Pour compléter la détermination de la réiodistribution à partir des résultats expérimentaux connus (TAG et β -MAG), la composition en acides gras (% molaire) des positions 1 et 3 du glycérol est calculée par la formule suivante [Grondin et al., 1997 ; Christie, 1986] :

$$[Sn-1,3]\% = \frac{3[TAG]\% - [Sn-2]\%}{2}$$

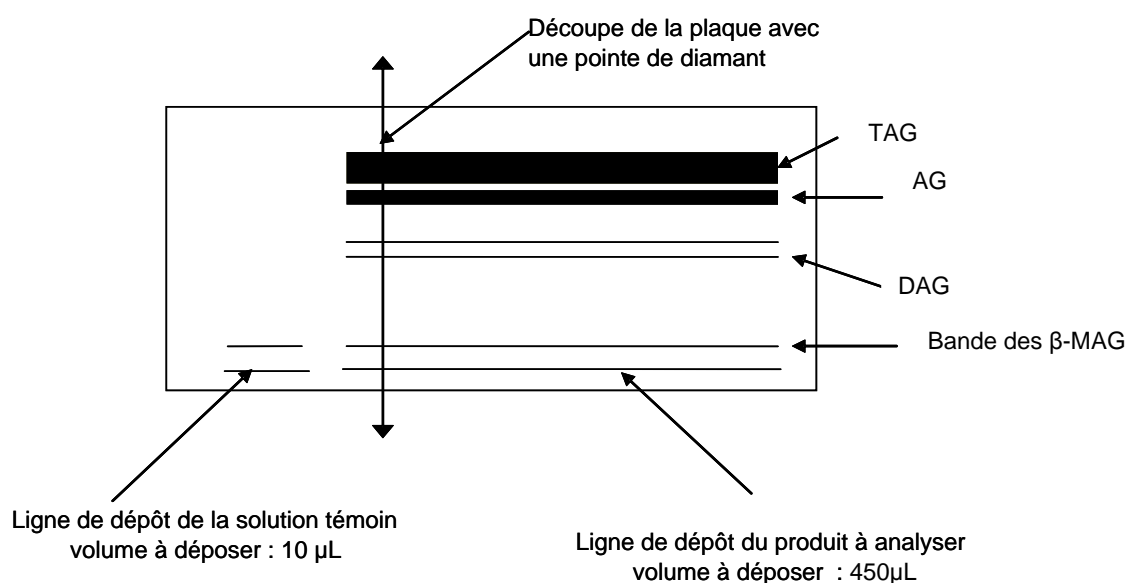


Figure II 5 : isolement de la bande des β -monoglycérols

II.1.7- Détermination de la composition en stérols des beurres

La détermination de la composition en phytostérols nécessite trois étapes :

- l'extraction des insaponifiables.
- l'isolement des stérols par chromatographie sur couche mince.
- le dosage par chromatographie en phase gazeuse.

II.1.7.1- Extraction des insaponifiables en vue du dosage des phytostérols

Une masse de 0,5 g de beurre est portée à reflux avec 5 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0.5 mol/L) et 1 mL d'étalon interne (cholestérol 1 mg/mL) pendant un quart d'heure. Après ajout de 5 mL d'éthanol par le haut du réfrigérant et refroidissement du ballon, les insaponifiables sont séparés par chromatographie sur colonne d'oxyde d'aluminium avec une élution effectuée à l'aide de l'éther diéthylique.

Un isolement par chromatographie sur couche mince de gel de silice permet de récupérer la bande des stérols. Le solvant de développement est un mélange Chloroforme/Ether éthylique dans les proportions 90/10 (v/v). Un dépôt d'une solution de référence contenant exclusivement le cholestérol permet de repérer la bande des stérols. Les stérols récupérés après désorption de la silice et filtration sur filtre Millipore sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

II.1.7.2- Dosages des stérols par CPG

Après isolement, les stérols sont analysés par Chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe de type GC 8000 est équipé d'une colonne SAC 5 {L= 30m; D= 250µm; P.S (95% Diméthylpolysiloxane et 5 % Diphénylpolysiloxane) ϕ =0.25 µm)}, d'injecteur Split avec un ratio de 1/100 et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les températures du four, de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 285, 300, 300°C. Le gaz vecteur est l'hélium et son débit est de 1,5 millilitre par minute. Des témoins de stérols injectés permettent l'identification.

Calculs

Pourcentage du stérol :

$$\% \text{ stérol} = (\text{Aire du pic du stérol} / \Sigma \text{ Aires}) \times 100$$

Avec : $\Sigma \text{ Aires}$ = Somme des aires des pics identifiés (soustraire celui de l'étalon interne).

Teneur du stérol en mg / 100 g de matières grasses :

$$T = (\text{Aire du pic du stérol} \times m_c \times K \times 100) / (A_c \times m)$$

Avec : m_c = masse en mg de cholestérol ajouté, soit 1 mg.

m = masse en g de l'échantillon prélevé.

A_c = Aire du pic du cholestérol.

K = facteur de réponse du stérol calculé en fonction de l'aire de l'étalon interne pour une concentration identique, soit 1.

II.1.8- Détermination du profil triglycéridique

La séparation des composés en HPLC est basée sur l'interaction entre la phase stationnaire et les solutés transportés par la phase mobile, ces interactions sont relatives aux différences de polarités des composés, de leurs poids moléculaires.

Les triacylglycérols sont analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La chaîne HPLC (Thermofisher (France)), comporte une pompe (Modèle Spectra System P1000xR), un passeur d'échantillon automatique (Modèle Spectra System AS1000) et un détecteur à diffusion de lumière (DDL, Modèle ALLTECH, 500 ELSD). Deux colonnes C18 de type QS LICHROSPHER 5 ODS 2 (5 μm , 250x 4.6 mm) d'INTERCHIM maintenues à 30°C sont utilisées pour la séparation. Le débit dans les colonnes est de 1 millilitre par minute, la pression de l'ordre de 1300 et la boucle d'injection de 100 μL . Le solvant d'élution est composé d'un mélange Acétonitrile/Acétone (50/50, solvant A) et chloroforme (solvant B). L'élution est effectuée avec un gradient linéaire comme suit ; 0 min 100% de A, 60 min 80% de A que l'on maintient pendant 20 min, puis on retourne aux conditions initiales

en 5min, qui sont conservées pendant 15min. la détection au DDL est effectuée à 40°C et à la pression de 42 psi. L'analyse est effectuée sur le beurre (5 mg/mL) dissout dans l'acétone. Le volume d'injection est de 20 µL.

II.1.9- Analyse des tocophérols

Elle est effectuée par HPLC selon la norme ISO 9936.

Les différents modules de l'appareil sont fournis par Thermofisher (France). L'HPLC se compose d'une pompe (Modèle Spectra System P1000xR), d'un injecteur automatique (Modèle Spectra System AS1000) et d'un détecteur à fluorescence (Modèle Spectra System FL3000). La colonne de silice utilisée est de type Hypersil Silica (Si 60, 5 µm, 250x 4.6 mm). Le mélange de solvant d'élution est composé d'hexane et dioxane pour HPLC (97/3, v/v). Le débit dans la colonne maintenue à 30°C est de 1 millilitre par minute, la pression de 350 psi avec un détecteur à fluorescence ($\lambda_{exc.}$ à 290 nm et $\lambda_{ém.}$ à 330 nm), la boucle d'injection de 100 µL et le volume d'injection de 20 µL. les tocophérols sont identifiés et quantifiés par des chromatogrammes étalons de α , β , γ et δ - tocophérols de concentrations variées.

Expression des résultats

$$\text{Teneur en } \mu\text{g/g du tocophérol} = (\rho \times A \times V) / (A_s \times m)$$

Avec :

ρ : Concentration, en mg/mL du tocophérol dans la solution étalon.

A : Moyenne des surfaces des pics obtenus avec l'étalon du tocophérol.

V : Volume de la solution d'essai préparée.

A_s : Moyenne des surfaces des pics pour le tocophérol avec l'échantillon pour essai.

m: masse en grammes de la prise d'essai

II.1.10- Détermination de la teneur en solide des différents beurres par RMN pulsée basse résolution

II.1.10.1- Principe de la méthode

La détermination de la teneur en solide par RMN pulsée basse résolution est basée sur la mesure du temps de relaxation de proton et se résume comme suit:

Les protons (dont le moment angulaire intrinsèque ou spin, peut être assimilé à un petit barreau aimanté ou dipôle) d'un échantillon placé dans le champ d'un aimant, se magnétisent parallèlement à ce champ. En appliquant un autre champ magnétique perpendiculaire au premier sous forme d'une impulsion radiofréquence pendant un temps très court quelques secondes, les dipôles nucléaires prennent une direction perpendiculaire à la première. Lorsque cette impulsion s'arrête, le retour à l'état initial du dipôle induit un signal électrique décroissant que l'on observe sur la bobine de mesure entourant l'échantillon. Ce signal est appelé la courbe de décroissance de l'induction libre (FID en anglais, Free Induction Decay) et représenté sur la Figure II 6.

La durée de la décroissance de l'amplitude du signal diffère selon l'appartenance des protons à la phase solide ou liquide. Elle est assimilée à un phénomène de « relaxation transversale » ou « spin-spin ». La durée de décroissance est très courte pour les protons de la phase solide mais plus longue pour ceux de la phase liquide.

L'amplitude S du signal RMN mesurée immédiatement ($10\ \mu\text{s}$) après l'impulsion est proportionnelle à la quantité totale de proton dans la phase solide. Tandis que l'amplitude L du signal RMN après la relaxation du solide ($70\text{ à }200\mu\text{s}$) est proportionnelle à la teneur en protons de la phase liquide.

La mesure des deux amplitudes permet de calculer la teneur en solide d'une graisse à une température donnée et de tracer sa courbe de fusion.

$$- \quad \% \text{ solide} = 100 \times S / (S + L)$$

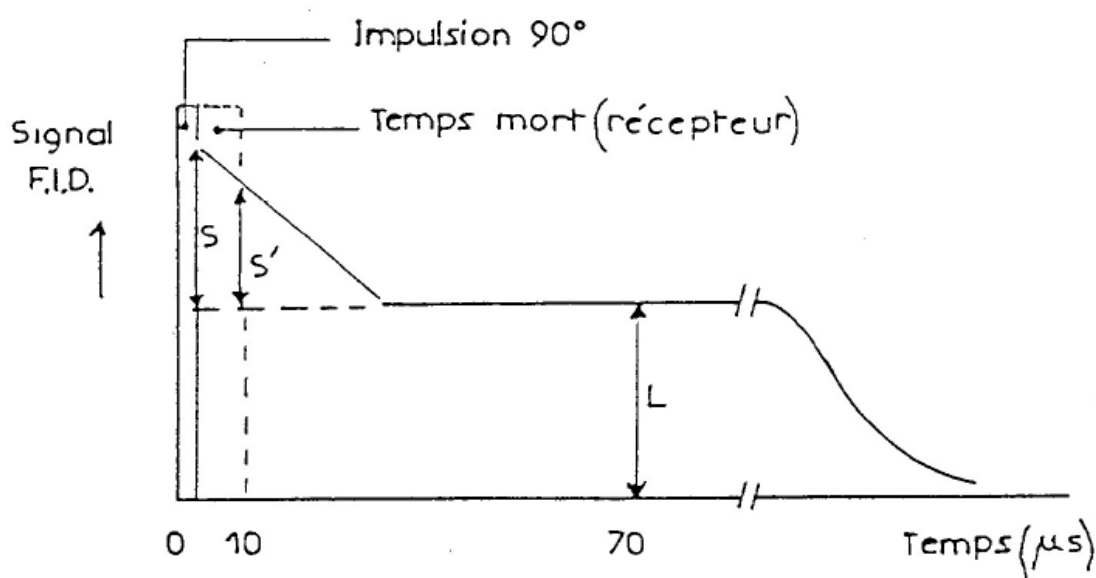


Figure II 6 : Signal de décroissance de l'induction libre

II.1.10.2- Conditions opératoires (norme ISO 8292 :1991(F))

- Prétraitement thermique

La teneur en solide d'un corps gras à une température inférieure à sa température de fusion dépend de l'historique antérieur de cristallisation de l'échantillon et en particulier de la méthode utilisée lors de la solidification. Les triacylglycérols présentent le phénomène de polymorphisme, donc sont amenés à se mettre sous des formes cristallines de compacité moléculaire et de stabilité thermique différentes. Les trois formes cristallines sont dans l'ordre de stabilité croissante α , β' , β .

Le prétraitement a donc pour but d'amener l'échantillon sous la forme cristalline la plus stable, la forme β .

On introduit 2 mL d'échantillon liquide dans un tube (\varnothing 10mm ; L=177mm) sur 30 mm de hauteur ; l'échantillon est ensuite conservé au réfrigérateur.

Le prétraitement consiste à fondre l'échantillon à 80°C suivant le protocole établi.

- On le maintient pendant 5 minutes à 60°C, puis 90 minutes à 0°C, ensuite 40 heures à 26°C (étape de stabilisation) et enfin 90 minutes à 0°C.
- Pour la mesure de la teneur en solide, on maintient l'échantillon pendant 60-65 minutes à chacune des températures de mesures choisies.

- La mesure de la teneur en solide

Elle est faite sur un appareil de type BRUCKER MINISPEC PC 120 composé de 2 compartiments : un caisson contenant l'aimant chauffé à 40°C et muni de la tête de mesure et d'un compartiment électronique pour les réglages de l'appareil.

L'appareil est préalablement calibré en utilisant des échantillons à teneur de solide connue.

II.1.11- Détermination des comportements thermiques des beurres de *P.butyracea* par DSC (Etude de la fusion et de la teneur en solide)

La calorimétrie à balayage différentiel (DSC) est une technique utilisée pour analyser les propriétés thermiques des matériaux. Cette technique sert à étudier les domaines de températures et les enthalpies où se produisent les transitions telles que : la fusion, la cristallisation, les transitions vitreuses et les changements à l'état solide. Dans le cadre de cette étude, elle nous permettra d'estimer la plage de fusion, de cristallisation et la teneur en

solide des différents beurres de *P. butyracea* et les produits de leurs modifications par voies enzymatiques.

L'appareil de mesure est une DSC 2920 Modulated DSC de TA Instruments (New Castle, DE, USA). L'appareil est calibrée par de l'indium et le système thermique d'analyse est purgé par un courant d'azote pour éviter la condensation à basse température.

L'échantillon est prétraité thermiquement comme précédemment.

Les mesures sont effectuées sur une prise d'essai d'environ 10 mg de beurre pris à température ambiante et scellée hermétiquement dans une capsule en aluminium. Une capsule vide est utilisée comme référence.

La programmation en température de l'appareil permet de suivre la fusion du beurre et est résumé, comme suit.

L'échantillon est maintenu à -20°C pendant 5 minutes, on applique ensuite une montée de température de 5°C/min de -20°C à 60°C pour l'étude de la fusion, et enfin un isotherme de 5 minutes à 60°C.

- Estimation de la teneur en solide par DSC

Les courbes de fusion ont été utilisées pour le calcul de la teneur en solide puisqu'elles dépendent de la température [Lambelet and Raemy, 1983 ; Lambelet, 1986; Solis-Fuentes and Duran-de-Bazua, 2003 ; Solis-Fuentes and Duran-de-Bazua, 2004]. La teneur en solide est calculée en intégrant séquentiellement la courbe de fusion de DSC et en divisant les valeurs obtenues par toute la surface de la courbe fusion (équation ci-dessous et Figure II 7). Cependant il faut choisir une valeur de température permettant de définir une origine pour la teneur en solide, dans le cas qui nous concerne, on choisira une teneur en solide de 100% pour la température de -15°C.

$$Teneur\ en\ solide\ (T) = \frac{\int_T^{T_1} H(T)dT}{\int_{T_0}^{T_1} H(T)dT} \quad [Lambelet\ and\ Raemy\ ,\ 1983; Solis-Fuentes\ and\ Duran-de-Bazua,\ 2003]$$

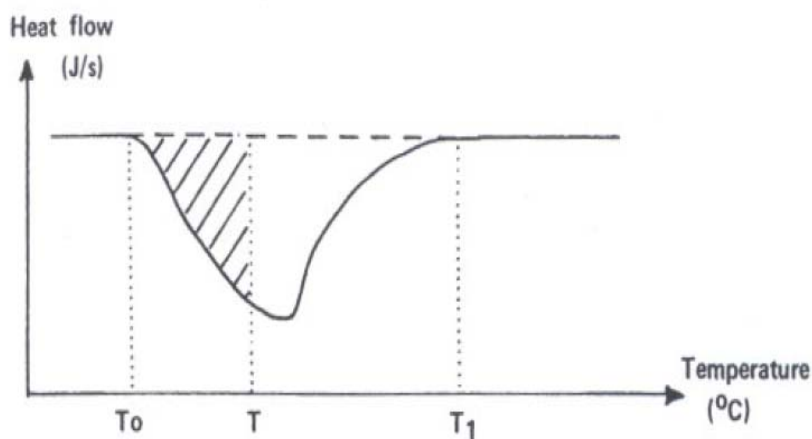


Figure II 7 : Détermination de la teneur en solide par la courbe de fusion de DSC

II.2- Caractérisation des tourteaux délipidés

II.2.1- Détermination de la teneur en phénols totaux dans les tourteaux

Tout comme la teneur en phénols des beurres, elle est effectuée par colorimétrie selon la méthode de Marigo (1973).

Elle est basée sur le dosage du pouvoir réducteur des composés phénoliques. Dans cette réaction d'oxydoréduction, le réactif de Folin et Ciocalteu utilisé est un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

II.2.1.1- Extraction des phénols

On pèse dans un tube à centrifuger 0,5 g (m) de tourteaux délipidés auquel on ajoute 35 mL de méthanol 70%(V/V) que l'on agite pendant 45 minutes à température ambiante. Puis le mélange réactionnel est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm. Le surnageant ainsi récupéré est transvasé dans une fiole de 50 mL, et le volume est ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée (solution A). L'extrait obtenu est dilué 10 fois avant le dosage colorimétrique des phénols.

Le réactif de Folin et Ciocalteu n'étant pas spécifique aux phénols, il est alors important de connaître l'absorbance due aux composés non phénoliques et de soustraire l'absorption relative à ces composés du résultat initial.

Marigo (1973) propose d'éliminer les phénols par adsorption par la polyvinylpyrrolidone et de mesurer donc l'adsorption du réactif par les composés autres que phénoliques, puis de soustraire ce résultat au total pour avoir l'absorption relative aux seuls composés phénoliques. Ainsi dans un tube à centrifuger contenant 1g de polyvinylpyrrolidone on verse 5mL de l'extrait de départ, 4 mL d'eau et 1 mL de tampon pH=3,5. L'ensemble est agité pendant 10min puis centrifugé à 12500 rpm pendant 5 min. Le surnageant obtenu est la solution B.

II.2.1.2- Dosage colorimétrique des composés phénoliques

Dans un tube à hémolyse sont versés successivement

- 0,4 mL de solution à analyser (A, B, acide gallique (pour étalonnage), eau)
- 2,4 mL d'eau
- 0,4 mL de Folin Ciocalteu
- 0,8 mL d'une solution de carbonate de potassium à 20 % (p/v) sont rajoutés après trois minutes de réaction.

Le mélange est maintenu dans un bain-marie pendant 20 minutes à 40°C et l'absorbance est lue à 760 nm avec un spectrophotomètre de type ANTHELIE ADVANCED 2 (France). L'acide gallique a été employé comme standard pour obtenir une courbe d'étalonnage des phénols totaux.

La différence de teneur entre la solution A et la solution B permet de déterminer la teneur en phénols totaux de l'échantillon.

Soit C_P la teneur en composés phénoliques, exprimée selon la formule suivante :

$$C_P = C_A - C_B$$

C_A teneur en composés réagissant avec le réactif de Folin et Ciocalteu

C_B teneur en composés réagissant avec le réactif de Folin et Ciocalteu après adsorption des phénols sur la polyvinylpyrrolidone

$C_A = (C \times V \times 10) / 1000m$ C concentration en mg/L obtenue sur la courbe d'étalonnage

$C_B = (C \times V \times 2) / 1000m$ et V volume de la fiole jaugée utilisée

II.2.2- Composition en glucides

II .2.2.1- Extraction des glucides

Elle est effectuée avec un extracteur automatique l'ASE 200 (Accelerated Solvent Extraction). L'ASE permet l'extraction sous l'action simultanée de la pression et de la température (Figure II 8). Les avantages de ce système sont multiples : rapidité, faible exposition aux solvants des opérateurs, quantités réduites de solvants, programmation facile.

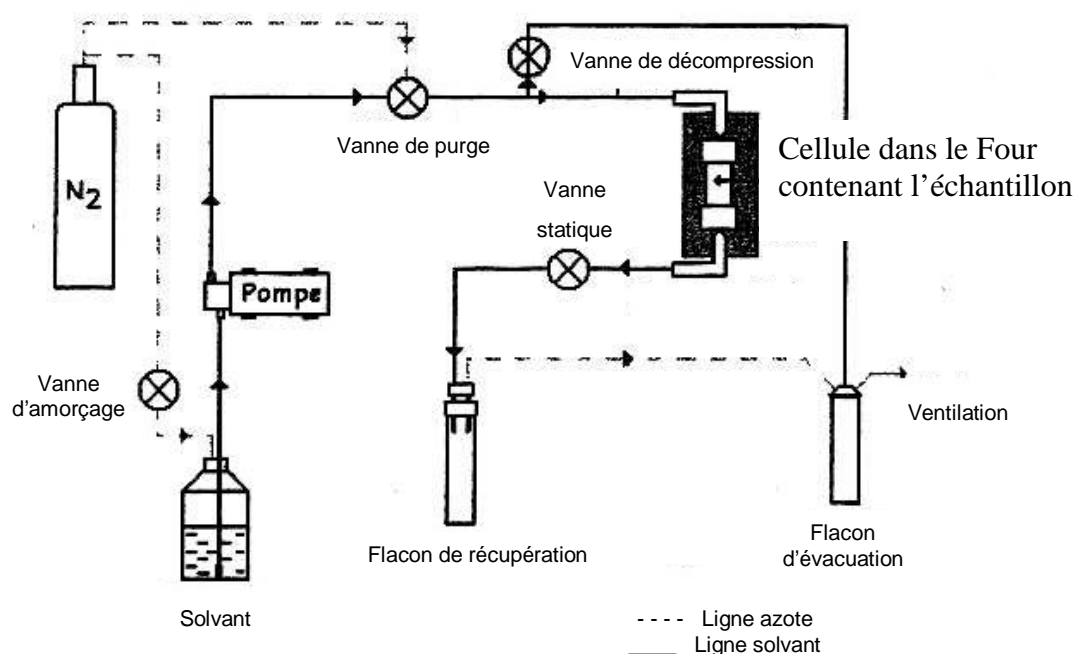


Figure II 8 : Principe de l'extraction à l'ASE

Les sucres ont été extraits à l'éthanol (80%) pendant 35 minutes à la pression de 100 bars et à la température de 80°C. L'extrait obtenu est transvasé dans une fiole de 50 mL et ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée. Pour l'analyse en chromatographie ionique haute performance, la solution est diluée 50 fois.

II.2.2.2- Analyse par chromatographie ionique

Les sucres sont des acides faibles dont le pKa est compris entre 12 et 13. En milieu basique une légère ionisation se produit et la séparation est possible sur une colonne constituée par une résine échangeuse d'ions de type anionique.

Pour ce dosage, on utilise un détecteur ampérométrique qui est constitué par une mini-cellule de voltampérométrie dans laquelle on produit l'oxydation des fonctions hydroxyles secondaires des sucres sur une électrode en or à un potentiel de + 0,10 V. Ainsi, l'analyse par chromatographie ionique nécessite la préparation d'éluant aqueux.

- Préparations des éluants

- Solution d'acétate de sodium (0,2 M) : solvant A

On introduit 8,2 g d'acétate de sodium dans une fiole jaugée de 500 mL que l'on ajuste avec de l'eau pure.

- Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M : solvant B

Introduire dans le bidon réservé à cet usage 1 litre d'eau pure, faire buller à l'hélium 1 à 2 minutes puis ajouter 5.2 mL de soude Baker 50%.

- Solution d'hydroxyde de sodium 0,002 M : solvant C

Introduire dans le bidon réservé à cet usage 2 litres d'eau pure, faire buller à l'hélium 1 à 2 minutes puis ajouter 0.2 ml de soude Baker 50%

- Dosage par HPLC

L'appareil et ses accessoires (pompes, injecteur, détecteur, colonne) sont des produits de Dionex (France), comportant une pompe (GP 50 gradient pump), un passeur d'échantillon automatique (ICS) et un détecteur ampérométrique (ED electrochemical detector). L'analyse est effectuée avec une colonne et une colonne de garde échangeuse d'anions de type DIONEX Carbo pac PA1 (250mm x 4mm). L'élution est faite avec un mélange isocratique (50% de solvant A et 50% de solvant B.). La colonne analytique est régénérée à la fin de chaque cycle d'élution par le solvant C puis reconditionnée par le solvant B, puis par le mélange isocratique.

Différentes solutions de standards et de références (glucose, fructose, saccharose) sont analysées à différentes concentrations pour l'identification des solutés et la calibration de l'appareil

Expression des résultats

$$\% \text{ sucre } X = (C \times V \times d \times 100) / (1000 \times 1000 \times m)$$

C : concentration en mg/L

V : volume de la fiole jaugée dans la procédure d'extraction des sucres (50ml)

d : facteur de dilution avant dosage chromatographique

m : prise d'essai en grammes

II.2.3- Déterminations des constituants pariétaux suivant la méthode aux détergents : séquences dites de Van Soest.

La détermination des constituants pariétaux est effectuée par la méthode aux détergents selon la norme AFNOR, NF V 18- 122. Elle permet de prédire la valeur énergétique des aliments pour animaux, après détermination du taux de cellulose, hémicellulose et de lignine. Les différents constituants pariétaux sont définis conventionnellement d'après le résidu organique insoluble obtenu après des traitements successifs par des détergents ; neutre, acide, et à l'acide sulfurique. Les résidus obtenus portent les noms : fibres au détergent neutre (NDF), fibres au détergent acide (ADF) et lignine sulfurique (ADL).

II.2.3.1- Préparation des solutions

- Solution au détergent neutre (NDS)

On introduit dans un bécher de 2 L, 37,22 g d'EDTA et 13,62 g de borate de sodium décahydraté et 400 mL d'eau distillée. Le bécher est chauffé jusqu'à dissolution du mélange et l'on ajoute alors 60 g de laurysulfate de sodium.

Dans un second bécher on pèse 9,12 g d'hydrogénophosphate disodé auquel on ajoute 400mL d'eau distillée. La solution est chauffée pour dissoudre complètement l'hydrogénophosphate disodé.

Les deux solutions sont ensuite mélangées et on ajoute enfin le triéthylèneglycol.

NB : vérifier que le pH de la solution se situe entre 6,9 et 7,1;

- Solution au détergent acide (ADS)

Elle est obtenue en ajoutant à 5 L d'une solution d'acide sulfurique (1 N), 100 g de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB).

- Solution d'acide sulfurique (72%)

C'est un mélange de 323 mL d'eau déminéralisée et de 677 mL d'acide sulfurique pur.

II.2.3.2- Préparation des échantillons

Les échantillons sont broyés à la grille de 1mm suivant la norme en usage pour les produits destinés à l'alimentation animale (Norme AFNOR NF V18-091). Dans notre cas les échantillons sont les tourteaux délipidés à l'hexane (extraction du beurre) et broyés à la grille de 1mm.

- Prétraitements enzymatiques

Elles sont nécessaires sur les échantillons contenant de l'amidon et des protéines

- Traitement à l'amylase thermosensible

On effectue une prise d'essai (P_0) environ 1g d'échantillon délipidé à 0,1mg près dans un sachet préalablement séché à l'étuve et pesé (P). Les sachets sont placés sur le dispositif d'hydrolyse. 2 L d'eau froide et 2 mL d'amylase sont alors ajoutés et chauffé à 100°C après agitation. Une fois le chauffage coupé, on laisse le mélange réagir pendant 10 min. L'appareil est ensuite vidangé et une quantité suffisante d'eau froide (2 L) est ajoutée pour un rinçage pendant 5 minutes et une nouvelle vidange est faite.

- Traitement à la protéase

Il s'effectue immédiatement après celui de l'amylase. On mélange dans un bécher, 2 L d'eau déminéralisée et 240 mg de protéase. Après dissolution complète sous agitation, la solution est versée dans l'appareil, qui est ensuite chauffé à $38 \pm 3^\circ\text{C}$. On laisse l'enzyme agir pendant 15 minutes. L'appareil est vidangé et rincé 5 minutes avec 2 L d'eau froide déminéralisée à température ambiante. L'opération est répétée deux fois.

- Détermination de la teneur en paroi végétale ou résidu NDS

On introduit dans le vase de digestion 2 L de solution au détergent neutre (NDS) et 3 gouttes de cyclohexanone. La température de consigne réglée à 100°C, on démarre le chauffage, l'agitation avec le compteur préalablement réglé à 70 minutes. Le temps écoulé, on effectue la vidange de l'appareil que l'on rince pendant 5 minutes avec 2 L d'eau bouillante déminéralisée et 2 mL de thermamyl. Le rinçage est repris pour éliminer totalement toute trace du détergent acide. Les sachets sont retirés du dispositif d'hydrolyse, puis sont rincés avec de l'acétone pendant 2 à 3 minutes et essorés manuellement.

Ils sont séchés à l'air libre pendant 10 minutes sous hotte, puis ils sont placés dans une étuve à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant une nuit. Ils sont pesés après refroidissement dans le dessiccateur et pesés (P_1).

- Détermination en lignocellulose ou ADF

On replace les sachets dans le vase de digestion et on ajoute 2 L de solution de détergent acide (ADF) et 3 gouttes de cyclohexane. Comme précédemment on règle la consigne de température à 100°C. Pendant 70 minutes et sous agitation, on laisse agir à chaud la solution de (ADF). A l'arrêt on procède comme ci-dessus et on pèse les sachets (P_2)

- Détermination de la teneur en lignine (ADL)

On place ensuite les sachets dans un bécher et on ajoute 250 mL d'acide sulfurique 72%. On maintient les sachets en immersion forcée dans la solution acide grâce à un erlen contenant de l'eau. On agite les sachets toutes les 30 minutes en agitant l'erlen par des mouvements de rotation.

Après 3 heures d'immersion, on retire les sachets que l'on rince avec de l'eau déminéralisée jusqu'à neutralisation. On rince à l'acétone pendant 2 à 3 minutes et on sèche les sachets (sous hotte). Les sachets sont placés à l'étuve à $105^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant une nuit puis on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse (P_3).

- Minéralisation des résidus

On sèche, puis on pèse autant de capsules en aluminium qu'il ya de sachets (P_4). On affecte à chaque sachet une capsule identifiable. L'ensemble est positionné dans le four à moufle froid. On effectue une montée en température progressive du four en 15 minutes jusqu'à un palier de 200°C, on laisse calciner pendant 30 minutes puis on augmente la température à 515°C en 20 minutes et on laisse agir pendant 1 heure 30 minutes. Après refroidissement du four à 100 °C, on retire les capsules et elles sont placées dans un dessiccateur pendant au moins 30 minutes avant pesée.

NB : les sachets doivent être hermétiquement fermés.

Expression des résultats

$$\% \text{ NDF} = [((P_1 - P) + 0,002) - (P_5 - (P_4 \times 0.0996))] \times 100 / P_0$$

$$\% \text{ ADF} = [((P_2 - P) + 0,002) - (P_5 - (P_4 \times 0.0996))] \times 100 / P_0$$

$$\% \text{ ADL} = [((P_3 - P) + 0,002) - (P_5 - (P_4 \times 0.0996))] \times 100 / P_0$$

0,002 g, facteur lié à la perte en poids de la capsule calcinée

0,996 g, facteur correctif relatif aux cendres du sachet

II.2.4- Dosage des minéraux et des éléments majeurs dans les tourteaux

La détermination des éléments minéraux majeurs s'effectue suivant la méthode de minéralisation par voie sèche suivie des dosages proprement dits par I.C.P (inductively coupled plasma). La méthode consiste à doser différents éléments minéraux par la mesure de leur concentration à leur longueur d'onde d'émission spécifique, l'échantillon étant en solution ionisée dans un plasma (argon à 10000 K).

A cet effet, les échantillons de tourteaux délipidés sont broyés à une granulométrie de 1mm à des fins d'homogénéisation par un broyeur à couteaux (Fritsch Pulverisette 15). Ils sont alors séchés à l'étuve à 60°C

II.2.4.1- Minéralisation voie sèche double calcination avec l'acide fluorhydrique

Elle consiste à l'élimination de la matière organique et la silice des échantillons, cette méthode permet de mettre en solution, en vue de leur dosage, des éléments minéraux tels que P, K, Ca, Mg, Na, B, Cu, Fe, Zn, Mn, Al, Ni, Cr, Mo, Cd, Pb, Co.

Elle s'applique à toutes matrices végétales et environnementales.

Mode opératoire

500 mg de matériel végétal précédemment traité, sont introduits dans une capsule en platine. La capsule est placée dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à 500°C et maintenue pendant 2 heures. Un pallier est effectué aux alentours de 200°C jusqu'à la fin du dégagement de fumées.

Après refroidissement, les cendres sont humectées avec quelques gouttes d'eau et on ajoute 2 mL de HCl (6N). On évapore à sec sur plaque chauffante et on ajoute à nouveau 2 mL de HCl au résidu, puis on laisse en contact 10 minutes. Le tout est filtré dans une fiole jaugée de 50 mL et le filtre contenant le résidu est alors calciné à 500°C.

De l'acide fluorhydrique est ajouté sur les cendres puis évaporé sur plaque chauffante, la silice contenue dans les cendres est volatilisée sous forme de SiF_6 .

Le résidu est repris par 1 mL de HCl 6N puis filtré dans la même fiole de 50ml.

Après avoir ajusté au trait de jauge avec la solution d'acide fluorhydrique puis homogénéisé par agitation manuelle, les solutions sont transvasées dans des godets pour être analysées par spectrométrie d'émission plasma.

II.2.4.2- Dosage, par spectrométrie d'émission plasma I.C.P. VARIAN-VISTA (P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Fe, Mn, Zn, Al et B)

Le principe de la spectrométrie d'émission plasma à couplage inductif est basé sur la formation de plasma dans un flux de gaz rare. Le plasma à couplage inductif est formé à partir d'une décharge électrique créée dans un flux d'argon gazeux circulant à travers une série de tubes de quartz concentriques (torche) entourés par une spire (bobine d'induction). Celle-ci est reliée à un générateur de radiofréquence. Le passage d'un courant alternatif dans la bobine d'induction produit un champ électromagnétique qui engendre des courants induits. La torche étant alimentée en argon, une étincelle est produite pour permettre l'excitation de l'argon gazeux. Les électrons sont accélérés par le champ électromagnétique ; il en résulte une collision entre atomes d'argon et une production subséquente d'un plus grand nombre d'électrons et d'ions argon, qui seront eux-mêmes accélérés. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que le gaz soit fortement ionisé. On obtient « in fine » la formation du plasma à la température de 10.000 Kelvins.

L'échantillon liquide est nébulisé puis transmis vers le plasma. Il subit différentes étapes de décomposition, d'atomisation et d'ionisation conduisant à une excitation des atomes et des ions. Après excitation, les atomes contenus dans l'échantillon émettent de la lumière dont la longueur d'onde leur est caractéristique. La lumière est transmise par l'intermédiaire du système optique (réseau + prisme) vers un détecteur, qui permet le dosage. Les limites de détection des éléments traces varient selon l'élément : elles sont de l'ordre du ppb ou de la dizaine de ppb.

Le spectromètre, de marque Varian Vista, est équipé du détecteur CCD (Coupled Charge Device). Il permet la détermination simultanée, à plusieurs longueurs d'ondes, de tous les éléments de la classification périodique des éléments à l'exception des corps gazeux.

Les dosages sont effectués en réalisant un étalonnage qui respecte les conditions du milieu analysé : matrice et acidité.

Les calculs sont effectués par interpolation par rapport à la gamme d'étalonnage. La validation des résultats analytiques repose sur l'analyse d'échantillons de référence internes, dont la teneur en éléments minéraux est connue.

II.2.4.3- Détermination de la teneur en azote total après combustion sèche (Méthode Dumas) (analyse élémentaire LECO-FP 528)

Une prise d'essai de chaque échantillon préalablement broyé et homogénéisé (de 50 à 150 mg selon le type d'échantillon) est pesée dans une feuille d'étain et placée sur le passeur d'échantillon.

L'échantillon est alors introduit dans un four à environ 850°C dans un flux d'oxygène.

Les gaz de combustion subissent une série de piégeage pour éliminer les poussières, les halogènes, la vapeur d'eau et les oxydes de carbone.

Une réduction sur colonne de cuivre à 730°C dans un flux d'hélium permet de réduire les oxydes d'azote en gaz N₂.

La teneur en azote est déterminée par une cellule thermoélectrique (catharométrie) après une calibration avec des substances de composition en azote connue (EDTA, Glycine..).

II.2.5- Dosage des protéines dans les tourteaux

La détermination des acides aminés totaux nécessite leur libération dans la structure protéique, par une hydrolyse dans l'acide chlorhydrique (6N). Cette hydrolyse s'effectue sur des substrats oxydés ou non, selon la nature des acides aminés à analyser. Les acides aminés libres sont extraits à l'acide chlorhydrique 0,1N.

La cystéine et la cystine sont déterminées sous forme d'acide cystéique, la méthionine sous forme de méthionine sulfone tandis que les autres sont déterminés tels quels après hydrolyse. Le dosage par chromatographie ionique sur colonne échangeuse d'ions au moyen de tampon de pH et de force ionique croissant. La détection s'effectuant par colorimétrie à 570 nm (440 nm pour la proline et l'hydroxyproline) et le calcul de la concentration en acides aminés par comparaison avec des solutions étalons.

II.2.5.1- Acides aminés liés

Oxydation du substrat

On pèse 5 g d'échantillon à analyser dans un flacon à vis de 125 mL, dans lequel on ajoute 5 mL d'un mélange d'oxydation (21 mg de phénol, 4,5 ml d'acide formique et 0,5 mL de peroxyde d'hydrogène). Le flacon fermé est maintenu à 50°C dans un bain-marie pendant 15 minutes. Le flacon est retiré du bain marie et le réactif excédentaire est dégradé par addition d'environ 0,84 g de disulfite de sodium.

Hydrolyse

Dans un flacon on ajoute 50 mL de solution d'hydrolyse (composé de 5 g de phénol, de 2,5 L d'acide chlorhydrique (37%) et ajusté à 5 L avec de l'eau dans une fiole) et 1 mL de norleucine à 2,5% à l'échantillon ou au résidu d'oxydation. Le flacon fermé est placé dans une étuve à 110°C pendant 24 heures. Après un refroidissement à température ambiante, on ajoute 50 mL d'eau déminéralisée puis on agite fortement. Le mélange est filtré rapidement dans un pot à usage unique. On effectue une seconde filtration sur cartouche filtrante à l'aide d'une seringue dans un tube à hémolyse. Le pH est ensuite ajusté à 2,2 au moyen de la soude 5 N ; à cet effet dans une fiole de 25 mL on mélange 0,5mL de filtrat, 0,25 mL de soude 5 N et 5,5 mL de tampon. Après agitation, on ajuste le volume à 25 mL avec la solution tampon et l'échantillon est prêt pour l'analyse chromatographique.

II.2.5.2- Acides aminés libres

A 5 g d'échantillon introduit dans une fiole jaugée de 100 mL, on ajoute de l'acide Chlorhydrique jusqu'au $\frac{3}{4}$ de la fiole environ. Le volume est complété à 100 mL après agitation pendant 30 minutes avec un agitateur magnétique. Le mélange est homogénéisé et après décantation, on filtre rapidement. Une seconde filtration est effectuée sur filtre millipore à l'aide d'une seringue dans un tube à hémolyse.

On prélève 1 mL de la solution précédente dans une fiole jaugée de 25 mL, puis on ajoute 1 mL de norleucine à 0,05% et on complète le volume à 25 mL avec la solution tampon précédente. L'échantillon peut être ainsi analysé par chromatographie.

La teneur en acide aminé est définie par la formule suivante

$$\text{g d'acide aminé/100g d'échantillon} = a \times A_s \times \frac{A_e}{A_i} \times \frac{D}{C \times m} \times 100$$

où a : est le coefficient de réponse de l'acide aminé

A_s : L'aire de l'acide aminé dans l'échantillon

A_e : L'aire de l'étalon interne dans la solution d'étalon

A_i : L'aire de l'étalon interne dans l'échantillon

D : Facteur de dilution

C : Facteur de conversion (pour passer des μg aux g)

m : Masse de l'échantillon (g)

II.3- Synthèse d'un équivalent de Beurre de Cacao

II.3.1- Utilisations des lipases microbiennes

II.3.1.1- Choix du Rapport molaire

Les réactions modèles sont conduites par acidolyse ou par transestérification en milieu hexanique. Le milieu réactionnel est constitué d'un mélange de différents ratios molaires de beurre de *P. butyracea* et d'acide palmitique, ou de palmitate d'éthyle (3/1 ; 2/1 ; 1/1 ; 1/2 ; 3/1) en présence des lipases *Candida Antartica* et *Thermomyces lanuginosa* représentant 10% (m/m) des substrats.

Pour la mise en œuvre de la réaction, on pèse 200 mg de beurre dans 10 mL d'hexane avec une masse équivalente de palmitate d'éthyle correspondant aux différents rapports molaires ci-dessus cités dans un flacon hermétiquement fermé. Les réactions sont conduites à 55°C dans une étuve thermorégulée et les flacons sont continuellement agités à 200 rpm.

Des aliquotes de 50 µL prélevés à différents temps de réaction sont dissouts dans 450 µL hexane et filtrés pour être analysés en HPLC selon la programmation décrite pour l'analyse des triacylglycérols.

II.3.1.2- Fractionnement du beurre.

Le beurre de *P. butyracea* est dissout dans différents volumes d'hexane dans les rapports (m/m) de 1/1, 1/2, 1/3, 1/5, 1/10 puis maintenu à 0°C pendant 24 heures.

Les deux phases (solide et liquide) sont séparées rapidement par simple filtration. La composition en acides gras et en triacylglycérols des différentes fractions est obtenue respectivement par CPG et par HPLC (mode opératoire: cf. analyse des acides gras et des triacylglycérols du beurre).

II.3.1.3-Transestérification du beurre Fractionné

Au vu des réactions précédentes, les réactions de transestérification sont conduites dans un ratio beurre fractionné/palmitate d'éthyle de 1/3 au cours de cette étude et en milieu hexanique.

II.3.1.4- Purification des produits de la réaction et caractérisation par DSC

La purification des produits de réactions est réalisée par chromatographie sur couche mince de plaque de silice (plaques de verre recouvertes de gel de silice 60, 1 mm d'épaisseur et de dimensions 20 x 20 cm, Alltech). Le solvant de développement est un mélange hexane/éther diéthylique/Acide acétique (50 : 50 : 1 ; v/v/v). Un dépôt témoin de triacylglycérols est effectué sur la plaque afin de repérer la bande des triacylglycérols. Après révélation, la bande des triacylglycérols est grattée et désorbée pour l'analyse en DSC.

L'analyse par DSC est conduite comme dans le paragraphe de la détermination des comportements thermiques des beurres de *P. butyracea*.

II.3.1.5- Etude de la cinétique de transestérifications à différentes activités de l'eau

Les lipases sont placées séparément comme précédemment dans des dessiccateurs contenant des solutions saturées en sels, pendant 4 semaines à 25°C. Les différents sels utilisés sont : NaOH ($a_w = 0.05$), LiCl ($a_w=0.12$) ; KAc($a_w=0,22$) ; MgCl₂ ($a_w = 0.33$) ; K₂CO₃ ($a_w = 0,42$).

Les réactions de transestérification sont effectuées avec des substrats dans un ratio beurre fractionné /palmitate d'éthyle de 1/3 en présence de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* (10% (m/m) substrat). Pour suivre la cinétique de la réaction, des aliquots sont prélevés comme précédemment et analysés en HPLC.

Pour suivre les modifications, les produits de réactions sont purifiés et analysés par DSC tout comme au paragraphe précédant.

II.3.1.6- Etude de la variation de la quantité de catalyseur, de la température et du solvant

Afin d'étudier l'influence de la quantité de catalyseur, les réactions entre le beurre fractionné et le palmitate d'éthyle (ratio 1/3) sont mis en œuvre avec des quantités de lipases représentant 2%, 5%, 8% (m/m), de la quantité totale de substrat mis en jeu.

De même les réactions sont conduites dans le même ratio mais à diverses températures (30, 40, 50, 55, 60°C) et dans différents solvants avec 10% de catalyseur pour évaluer l'influence de la température et du solvant sur la réaction.

II.3.2- Utilisation des lipases végétales

Les papayers utilisés pour la récolte du latex sont localisés dans la commune d'Abomey-Calavi. La récolte des latex est réalisée sur des fruits verts et adultes, par saignée avec des lames en aluminium. Le latex frais est collecté dans des bocaux en verre qui sont conservés au congélateur à -18°C. Le latex est ensuite lyophilisé pour être utilisé pour la modification du beurre de *P. Butyracea*.

Pour une étude comparative, on utilise également le latex de papaye commercial de la compagnie sigma.

II.3.2.1- Isotherme de sorption et désorption du latex de papaye lyophilisée

L'isotherme de sorption et désorption de la préparation enzymatique est réalisé à 20°C, en utilisant un banc de sorption automatique équipé d'une balance de Khan de fine précision (sensibilité de 0,1 micro gramme) : le DVS-1. Surface Measurement Systems Ltd., Londres, Grande Bretagne. La préparation enzymatique est préalablement déshydratée sous SiO₂ dans un dessiccateur à 25°C pendant deux semaines avant d'être mise dans la microbalance.

Les analyses de sorption sont réalisées avec un échantillon de 20 mg, afin d'avoir un bon compromis entre l'homogénéité de la préparation, la sensibilité de l'appareil et la durée de l'analyse. L'échantillon est équilibré à des différents paliers d'humidité relative de 10 à 95% dans le cas de l'adsorption avec des étapes de 10 % d'humidité et le chemin inverse est effectué dans le cas de la désorption pour estimer l'hystérèse du matériel. La durée des différents paliers est fixée à 8 heures pour des humidités relatives faibles (en dessous de 60%) et à 24 heures pour les autres de sorte que la variation de masse de l'échantillon à la fin de chaque étape soit inférieure à 0,001%.minute⁻¹. Pour l'expression des résultats : $a_w = HR/100$, à l'équilibre.

Les données des isothermes de sorption ont été modélisées en utilisant l'équation de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB).

$$X = \frac{X_m \cdot K \cdot C_g \cdot a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C_g K a_w)}$$

Où X est l'humidité relative (g/g de latex), X_m l'humidité relative pour la première couche (g/g d.b.), C_g est une constante liée à la chaleur de la sorption de la première couche, K est une constante liée à la chaleur de la sorption du multicouche et a_w l'activité de l'eau

II.3.2.2- Mesure de l'activité du latex de papaye lyophilisé.

II.3.2.2.1- Mesure de l'activité en hydrolyse

Un mélange de 1,75 mL d'huile d'olive et 8,75 mL de solution de gomme arabique (10% : m/m) est émulsionné mécaniquement dans 20 mL d'une solution aqueuse de NaCl (0,22 M) à l'aide de l'ultraturax. le mélange réactionnel est stabilisé à la température 50°C et le pH est ajusté à la valeur de 8,0 par addition d'une solution aqueuse de NaOH 0,1M. Après 10 min de stabilisation à pH constant, la lipolyse enzymatique est initiée par l'ajout de 20% (m/m) de lipase (Papaye lyophilisé (PB) papaye sigma (PS))

Le titrage des AG libérés est réalisé par titrimétrie à pH 8,0 stationnaire avec une solution aqueuse de NaOH 0,1 M, en employant un pH-Stat.

II.3.2.2.2- Détermination de l'aptitude à l'interestérification

Cette étude consiste au transfert d'acyles entre deux TAG homogènes. Le milieu réactionnel est composé de 0.3 mmol de tricapryline (C8 :0) et de 0.1mmol trioléine (C18 :1) dans 5 mL d'hexane à 55°C dans un incubateur à 250 rpm. La réaction est amorcée par l'ajout de 10% de lipase végétale (latex de papaye lyophilisé).

Des aliquotes de 50 µL prélevés à des intervalles de temps fixé, puis dissouts dans 2 mL hexane sont analysés par CPG.

Le chromatographe de type GC 8000 est équipé d'une colonne capillaire HP 1 (15x0.53x0.15) d'injecteur « on colonne » avec un ratio de 1/100 et d'un détecteur à ionisation de flamme. La température du four est donnée par la programmation 140 à 340°C avec une montée de 10°C/min et reste à 340°C pendant 10 min, tandis que le détecteur est à 340°C. Le gaz vecteur est l'hélium et son débit est de 1 millilitre par minute.

II.3.2.3- Utilisation dans la synthèse d'équivalent de Beurre de Cacao

Cette étude consiste à l'application des réactions de transestérification mise en œuvre précédemment aux deux lipases végétales que sont le latex de papaye lyophilisé et de papaye commercial. Ces réactions sont appliquées à deux rapports molaires beurre de *P. butyracea* ou beurre fractionné / palmitate d'éthyle (1/3 et 1/5). Le milieu réactionnel est analysé par HPLC pour la détermination du profil triglycéridique.

I- Caractérisation de la graine de P. butyracea

I.1- Extraction et caractérisation des différents beurres de *P. butyracea*

I.1.1- : Acidité, teneurs en eau et en huile des amandes

Les différentes amandes présentent des teneurs élevées en eau de l'ordre de 6 à 13% (Tableau III 1), avec une moyenne de 10%. La valeur la plus élevée est observée avec les graines de BP10 (14%) alors que la valeur la plus faible est de 6,3% pour l'échantillon BP11.

Ces valeurs assez grandes, se justifient par le fait que les graines de *P. butyracea* sont ramassées en saison pluvieuse (avril à juin) et la présence des arbres le long des cours d'eau (humidité élevée). En plus de ces différents facteurs, on peut noter les différences de pluviométrie, la durée et le mode séchage.

Les différentes teneurs en huiles (% de la matière sèche) consignées dans le Tableau III 1 montrent que les amandes de *P. butyracea* renferment en moyenne 43% de leur masse en huile. La teneur en huile la plus élevée est observée pour l'échantillon BP12 avec 49,1%. La teneur la plus faible de 35,8 % observée pour l'échantillon de BP7, serait due à une perte d'huile lors du processus de cuisson des graines pour la conservation. La teneur en huile des différents échantillons de *P. butyracea* est comparable à celle observée pour les graines de Karité (Di-Vincenzo et al, 2005).

L'acidité moyenne de ces différents beurres est de 1% (Tableau III 1), avec un écart assez important entre l'huile la moins acide (0,6%) et l'huile la plus acide (2,4%).

Tableau III 1 : Acidité (Ia), teneur en huile (TMG) et eau des amandes (T_E)

ID	T _E (% amande brute)	TMG (% SM)	Ia (% d'acide oléique)
BP1	10,9 ± 0,3	41,2 ± 0,9	0,6 ± 0,1
BP2	11,3 ± 0,2	45,7 ± 0,6	1,1 ± 0,1
BP3	11,4 ± 0,1	43,0 ± 0,7	0,7 ± 0,1
BP4	9,0 ± 0,3	41,9 ± 0,7	0,5 ± 0,1
BP5	9,3 ± 0,1	41,7 ± 0,3	0,9 ± 0,2
BP6	7,7 ± 0,1	41,1 ± 0,6	0,5 ± 0,1
BP7	8,5 ± 0,1	35,8 ± 1,1	0,7 ± 0,1
BP8	8,2 ± 0,4	46,3 ± 0,6	0,5 ± 0,1
BP9	9,4 ± 0,6	47,3 ± 0,8	2,2 ± 0,1
BP10	13,9 ± 0,1	39,1 ± 0,9	1,3 ± 0,2
BP11	6,3 ± 0,1	46,1 ± 0,8	0,6 ± 0,1
BP12	7,6 ± 0,2	49,1 ± 0,5	1,5 ± 0,1
BP13	10,3 ± 0,3	41,1 ± 0,8	2,4 ± 0,1

I.1.2- Teneur en insaponifiable

Les teneurs en insaponifiables (T_{ins}) des différents beurres de *P. butyracea* sont compris entre 0,8 et 1,8% (Tableau III 2). Ces valeurs sont conformes à celles obtenues par Adomako (1977) et Dencausse et al (1995). Le taux d'insaponifiable du beurre de *P. butyracea* est inférieur à celui du beurre de karité (4-15%) (Dencausse et al (1995), Derbesy et Richert (1979), Itoh et al (1980)). Cependant, le beurre de *P. butyracea* renferme un taux assez élevé en insaponifiable par rapport au beurre de Cacao (0,3 à 0,5%) et de même ordre que le beurre de *Canarium* (1%) (Agbo N'zi et al., 1992).

Tableau III 2 : Teneur en insaponifiable (T_{ins}) des différents beurres de *P. butyracea*

ID	T_{ins} (%)
BP1	$0,8 \pm 0,2$
BP2	$1,0 \pm 0,1$
BP3	$1,2 \pm 0,1$
BP4	$1,3 \pm 0,2$
BP5	$1,8 \pm 0,1$
BP6	$1,6 \pm 0,1$
BP7	$1,5 \pm 0,1$
BP8	$0,8 \pm 0,1$
BP9	$1,1 \pm 0,1$
BP10	$1,0 \pm 0,1$
BP11	$1,6 \pm 0,2$
BP12	$1,8 \pm 0,1$
BP13	$0,9 \pm 0,1$

I.1.3- Composition en acides gras (AG)

Les beurres de *P. butyracea* étudiés renferment un nombre relativement faible d'acides gras différents dont la chaîne carbonée varie entre 16 et 20 atomes dans des proportions extrêmement différentes (Tableau III 3). Cette composition est caractérisée par la présence de deux acides gras largement majoritaires, l'acide stéarique (38 à 47%) et l'acide oléique (48 à 58%) qui représentent près de 96% des acides gras totaux (Figure III 1) (Tchobo et al, 2007). L'acide palmitique est présent dans une proportion moyenne de 3%, l'acide linoléique pour une teneur comprise entre 0,5 et 1%. Les autres acides gras présentent des

pourcentages inférieurs ou égaux à 0,2%. Le beurre de *P. butyracea* renferme très peu d'acides gras polyinsaturés ($\leq 1\%$).

Le beurre de *P. butyracea* possède une composition assez semblable au beurre de karité, avec deux acides gras majoritaires mais le karité est plus riche en acides gras polyinsaturés avec 7,5% d'acide linoléique (C18 :2). Le beurre de cacao dans sa composition en acides est autant riche en acide oléique, stéarique et palmitique (30%) ce qui rend sa composition différente de celle des deux autres beurres. Des différents beurres étudiés, le beurre de cacao est celui qui contient le plus d'acides gras saturés, près de 60 % tandis que les autres renferment autant d'acides gras insaturés que saturés. Le beurre de *Canarium* dans sa composition en acides gras est différent des trois beurres étudiés ci-dessous car composé à 84% d'acide stéarique (Agbo N'zi et *al.*, 1992).

Tableau III 3 : Composition en acides gras des différents beurres de *P. butyracea*, de karité et de cacao

	C16 :0	C16 :1	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3	C20:0	C20:1	AGS	AGI	AGPI
BP 1	3,2	0,1	47,1	48,7	0,6	0,2	0,1	-	50,4	49,6	0,8
BP 2	3,6	0,1	43,2	52,0	0,7	0,2	0,1	-	46,9	53	0,9
BP 3	3,3	0,1	47,0	48,7	0,5	0,1	0,1	-	50,4	49,4	0,6
BP 4	2,9	0,1	38,4	57,6	0,6	0,2	0,1	-	41,4	58,5	0,8
BP 5	3,9	0,2	43,2	51,6	0,7	0,2	0,1	-	47,2	52,7	0,9
BP 6	3,3	0,1	43,9	51,8	0,6	0,1	0,1	-	47,3	52,6	0,7
BP 7	2,8	0,1	45,4	50,8	0,5	0,2	0,1	-	48,3	51,6	0,7
BP 8	2,7	0,1	45,5	50,8	0,5	0,2	0,1	-	48,3	51,6	0,7
BP 9	3,4	0,1	46,3	49,3	0,6	0,1	0,1	-	49,8	50,1	0,7
BP 10	2,9	0,1	42,8	53,2	0,7	0,2	0,1	-	45,8	54,2	0,9
BP 11	2,6	0,1	45,7	50,6	0,6	0,2	0,2	-	48,5	51,5	0,8
BP 12	2,6	0,1	44,8	51,5	0,7	0,2	0,1	-	47,5	52,5	0,9
BP 13	3,9	0,1	42,4	52,5	0,7	0,2	0,2	-	46,5	53,5	0,9
BK 1	5,3	-	41,3	44,3	7,2	0,3	1,1	0,3	47,7	52,1	7,5
BC	29	0,3	34,7	31,4	3,7	0,9	-	-	63,7	36,3	4,6

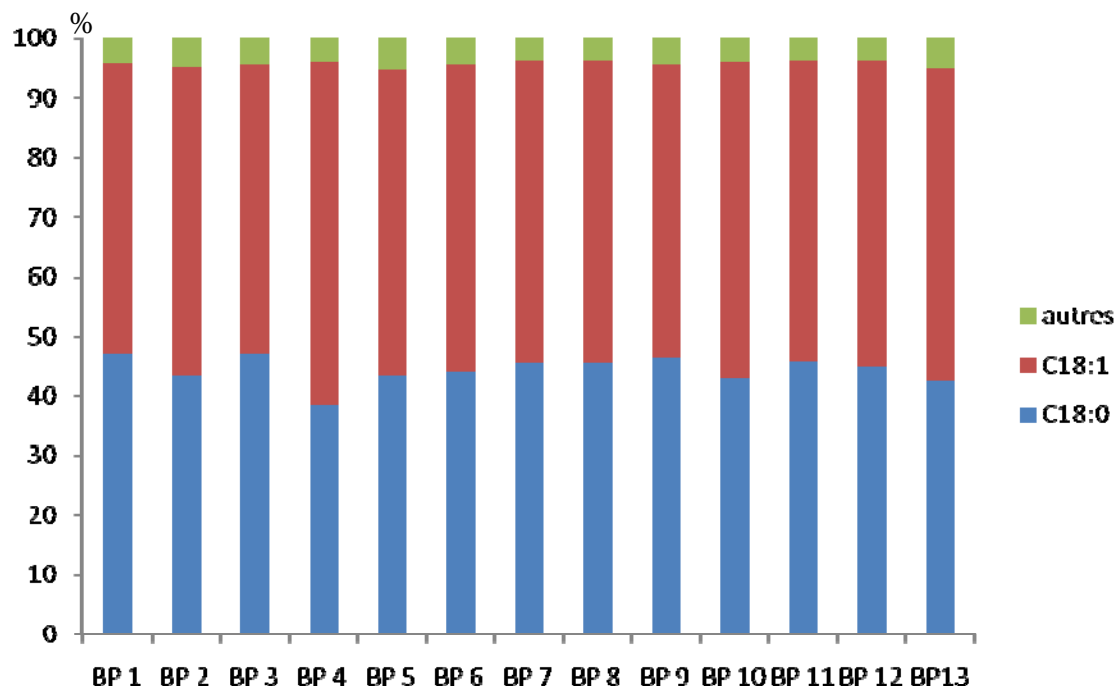


Figure III 1 : Représentation de la proportion de C 18 dans la composition en AG des différents beurres de *P. Butyracea*

I.1.4- Répartition des acides gras des triacylglycérols des différents beurres de *P. butyracea*

Le Tableau III 4 présente les résultats obtenus dans la répartition interne et externe des acides gras des triacylglycérols des différents beurres de *P. butyracea*. Au vu des résultats obtenus, on remarque que la composition en acides gras est sensiblement identique dans tous les triacylglycérols. Les acides gras saturés, notamment l'acide palmitique représente 2,8 à 4,8 % (tout l'acide palmitique est en position externe) et l'acide stéarique 59,5 à 75% des acides gras en position externe tandis que l'acide oléique constitue 98% des acides gras en position interne. Le BP présente ainsi la distribution habituelle des acides gras dans les triacylglycérols des corps gras végétaux à savoir que les acides gras insaturés occupent ainsi majoritairement la position 2 alors que les acides gras saturés sont localisées préférentiellement dans les positions 1 et 3 de la molécule de glycérol [Grondin et *al.*, (1997) ; Gunstone (1962) ; Gunstone et *al.*, (1965)].

La présence de l'acide oléique en position interne du beurre de *P. butyracea* en fait ainsi un substrat potentiel pour la synthèse d'équivalent de beurre de cacao par catalyse enzymatique, ceci en accord avec les observations de Xu (2000).

Tableau III 4 : Répartition des acides des différents échantillons de beurre de *P. butyracea*

Acides Gras	BP 1			BP 2			BP 3			BP 4			BP 5			BP 6			BP 7		
	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3
C16 :0	2,6	0	3,8	2,7	0	4,1	2,7	0	4,0	1,9	0	2,8	2,8	0	4,2	3,2	0	4,8	2,7	0	4,1
C18 :0	50,2	0,9	74,9	46,1	0,8	68,7	50,4	1,0	75,2	40,2	1,4	59,5	47,0	1,8	69,6	45,7	0,9	68,1	46,8	0,9	69,8
C18 :1	46,9	98,4	21,2	50,9	98,2	27,3	46,6	98,3	20,7	57,6	97,8	37,6	50,0	97,6	26,1	50,7	98,3	26,9	50,1	98,5	25,9
C18 :2	0,3	0,7	0,1	0,4	1,0	0,0	0,3	0,8	0,1	0,3	0,8	0,1	0,3	0,6	0,1	0,5	0,9	0,3	0,4	0,6	0,3

Tableau III 4 : Répartition des acides gras des différents échantillons de beurre de *P. butyracea* (suite)

Acides Gras	BP 8			BP 9			BP 10			BP 11			BP 12			BP 13		
	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3	TAG	Sn-2	Sn-1,3
C16 :0	1,6	0	2,4	2,6	0	3,9	2,3	0	3,5	2,5	0	3,7	2,0	0	3,0	3,3	0	5,6
C18 :0	47,7	1,2	70,9	49,5	0,9	73,9	44,7	0,8	66,6	46,4	0,9	69,2	48,7	1,4	72,4	45,9	1,4	68,2
C18 :1	50,4	98,2	26,5	47,6	98,3	22,3	52,6	98,6	29,7	50,6	98,5	26,6	48,9	97,8	24,5	50,4	97,4	26,9
C18 :2	0,3	0,5	0,1	0,4	0,8	0,1	0,3	0,6	0,2	0,5	0,7	0,4	0,4	0,8	0,2	0,3	0,9	0

I.1.5- Composition en triacylglycérols (TAG)

Les qualités texturales et rhéologiques du beurre dépendent largement des comportements thermiques et polymorphes des triacylglycérols qui le composent. Ces différents comportements sont le reflet de la concentration respective des différents triacylglycérols. Le Tableau III 5 donne la composition en triacylglycérols des différents beurres analysés. Des résultats obtenus, on constate la présence de cinq triacylglycérols (POO, POS, OOO, SOO, SOS) dans le beurre de *P. butyracea* (Figure III 2), dont les deux derniers SOO et SOS sont largement prédominants. Ces résultats confirment les observations d'Adomako (1977).

Il est à remarquer l'absence de tristéarine (SSS) et la faible teneur de la trioléine (OOO) malgré la teneur élevée de l'acide stéarique et de l'acide oléique. Dans la quasi-totalité des échantillons, le triacylglycérol SOS est majoritaire avec une concentration de plus de 50% alors que la teneur en SOO varie entre 35 et 45%.

Cependant, les échantillons BP 4 et BP 10 font exception avec des pourcentages de 57% et 49% respectivement de SOO pour 37% et 47% de SOS. De plus, la trioléine (OOO) de 3% au plus dans les différents échantillons, atteint 6 % dans l'échantillon BP4. Cette variabilité dans la composition en triacylglycérols de ces deux échantillons pourrait s'expliquer par la teneur élevée d'acide oléique ($\geq 53\%$).

L'étude de la composition en triacylglycérols du beurre de karité montre qu'il renferme les mêmes triacylglycérols majoritaires que le beurre de *P. butyracea* avec des proportions relativement semblables, néanmoins une différence est à noter dans la composition plus complexe des éléments mineurs du beurre de karité. Ces résultats sur le beurre de karité se trouvent confirmés avec les observations de Di-Vincenzo (2005).

Le beurre de cacao comparativement aux deux autres beurres, a une composition en triacylglycérols assez différente et trois triacylglycérols majoritaires. La fraction POS est le triacylglycérol principal avec un pourcentage de 56% suivi du SOS (30%) et du POP (12%).

Tableau III 5 : Composition en triacylglycérols des différents beurres de *P. butyracea*, de cacao et de karité

TAG ID	POO	POP	POS	OOO	SOO	SOS	Autres
BP 1	0,2 ± 0,1	-	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	38,3 ± 1,0	58,8 ± 0,8	-
BP 2	0,3 ± 0,1	-	1,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1	45,2 ± 0,9	50,1 ± 1,4	-
BP 3	0,2 ± 0,1	-	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	35,1 ± 1,5	61,4 ± 1,5	-
BP 4	0,3 ± 0,1	-	0,9 ± 0,1	6,5 ± 0,1	55,2 ± 0,2	37,1 ± 0,3	-
BP 5	0,3 ± 0,1	-	1,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	42,3 ± 0,4	53,2 ± 0,5	-
BP 6	0,3 ± 0,1	-	1,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	47,0 ± 1,1	48,7 ± 1,0	-
BP 7	0,2 ± 0,1	-	1,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	42,0 ± 0,9	54,0 ± 0,7	-
BP 8	0,2 ± 0,1	-	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	43,4 ± 1,3	53,3 ± 1,3	-
BP 9	0,3 ± 0,1	-	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	39,2 ± 1,0	56,7 ± 1,1	-
BP 10	0,2 ± 0,1	-	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	48,8 ± 0,6	47,0 ± 0,6	-
BP 11	0,2 ± 0,1	-	1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,1	43,4 ± 1,5	53,3 ± 1,7	-
BP 12	0,2 ± 0,1	-	0,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	42,9 ± 0,8	53,9 ± 1,2	-
BP 13	0,5 ± 0,1	-	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,1	44,5 ± 0,5	49,9 ± 0,4	-
BK	2,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	34,0 ± 0,9	56,4 ± 1,1	3,4 ± 0,2
BC	0,5 ± 0,1	12,4 ± 0,5	55,6 ± 2,3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	30,5 ± 1,2	0,5 ± 0,1

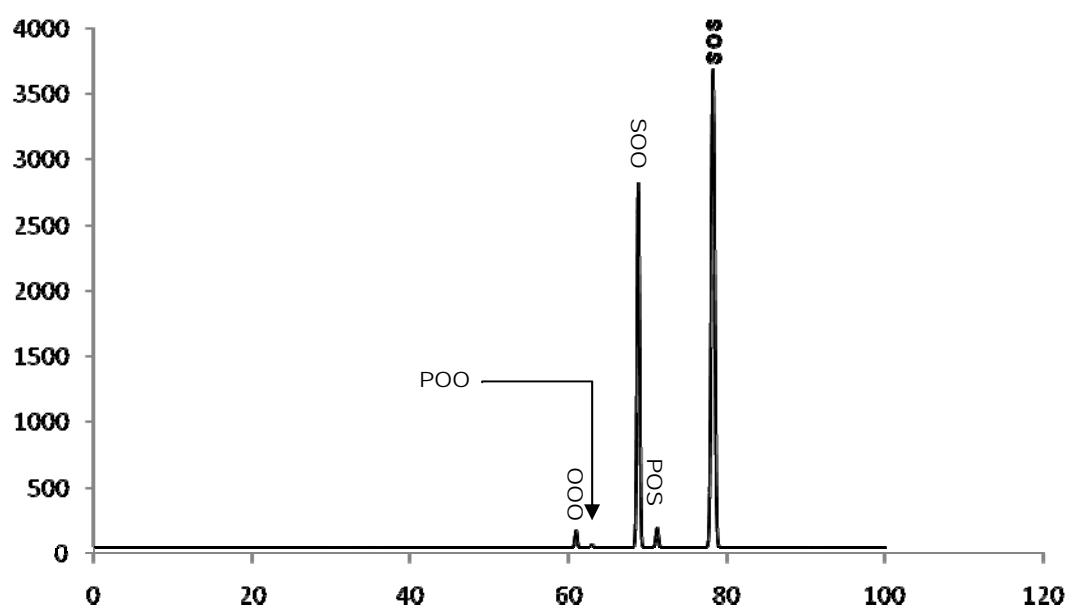


Figure III 2 : Chromatogramme HPLC des triacylglycérols d'un échantillon de beurre de *P. butyracea*

I.1.6- Composition en stérols

Les phytostérols sont généralement les composés majoritaires de la fraction insaponifiable des huiles végétales, et leurs propriétés hypocholestérolémiantes sont largement reconnues. La teneur moyenne en stérols du beurre de *P. butyracea* est de 1773 µg/g d'huile (Tableau III 6). Le plus faible taux est obtenu avec l'échantillon BP13 (1353 µg/g d'huile) alors que la teneur maximale de 2205 µg/g d'huile est obtenue pour l'échantillon BP1 soit une différence assez importante de 852 µg/g d'huile. L'identification des différents phytostérols montre qu'elle est composée essentiellement de Δ^5 stérols (97%). Le stigmastérol (59 à 69%) est le stérol majoritaire, accompagné du campestérol (16 à 29%), du β -sitostérol (3 à 7%) et du brassicastérol (3 à 6%). Le *P. butyracea* fait partie des rares trachéophytes dans lesquels le stigmastérol est majoritaire et le sitostérol minoritaire. La composition en phytostérols présente une variabilité dans sa composition en Δ^7 stérols bien qu'ils représentent moins de 3% de la teneur en stérols totaux. Cette composition en stérols est assez différente de celle obtenue par Dencausse et al. (1995), sur le *P. butyracea* de Korhogo (Côte d'Ivoire) qui renferme 22% de Δ^7 stérols (Tchobo et al, 2007). Cette différence pourrait être liée à l'origine des graines et constituerait alors un facteur d'identification. Cette composition en stérols est assez différente de celle du beurre de karité riche en Δ^7 stérols (Dencausse et al. (1995)).

Tableau III 6 : Composition en stérols des beurres de *P. butyracea*

Stérol	BP 1		BP2		BP 3		BP 4		BP 5		BP 6	
	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g
Brassicastérol	5,0	110	2,7	53	3,3	50	3,1	48	3,8	73	5,6	77
Campestérol	25,4	560	18,6	355	16,1	242	19,3	299	21,2	406	22,9	317
stigmastérol	59,0	1302	69,2	1322	68,2	1022	68,9	1068	68,6	1311	64,2	887
β- Sistostérol	6,7	148	5,3	102	8,5	127	5,3	82	3,0	57	4,7	65
Δ5-Avenastérol	1,4	30	-	-	0,7	11	0,7	11	1,0	19	0,7	9
Spinastérol	0,9	19	0,7	14	0,3	3	-	-	-	-	1,1	16
Δ7-stigmastérol	1,1	25	2	39	1,8	26	0,6	1	-	-	-	-
Δ7-Avenastérol	0,5	11	1,2	23	0,9	14	2,1	32	2,3	43	0,8	1
Totaux	2205		1908		1495		1550		1909		1381	

Tableau III 6 : Composition en stérols des beurres de *P. butyracea* (suite)

Stérol	BP 7		BP 8		BP 9		BP 10		BP 11		BP 12		BP 13	
	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g
Brassicastérol	5,6	75	4,0	76	4,4	71	2,7	56	3,3	58	6,2	93	5,3	71
Campestérol	25,2	337	20,8	398	20,0	320	25,1	519	28,4	491	27,6	420	22,5	305
Stigmastérol	60,2	805	68,7	1318	67,3	1076	65,7	1358	59,2	1023	56,3	839	65,7	891
β- Sistostérol	6,2	83	4,5	86	6,3	101	4,7	98	6,4	110	6,2	94	6,5	87
Δ5-Avenastérol	0,6	8	0,7	13	0,6	9	0,2	5	-	-	-	-	-	-
Spinastérol	0,4	6	0,2	4	0,3	4	0,3	7	0,7	13	1,6	16	-	-
Δ7-stigmastérol	0,5	7	0,4	7	0,4	6	0,7	13	1,0	17	1,3	20	-	-
Δ7-Avenastérol	1,1	14	0,8	15	0,6	10	0,5	10	1,0	17	0,7	10	-	-
Totaux	1335		1917		1597		2066		1729		1492		1354	

I.1.7- Composition en tocophérols

Les tocophérols représentent une classe importante d'antioxydants de type « chain-breaking » et permettent à ce titre de connaître certaines propriétés des huiles. Plusieurs facteurs liés à l'environnement (Climat, sol, etc.) influent sur la teneur en tocophérols (Maranz and Wiesman, 2004).

Le Tableau III 7 donne le profil en tocophérols des différents beurres de *P. butyracea* obtenu et la quantification avec des courbes d'étalonnage des différents tocophérols. La teneur moyenne en tocophérols est de 141µg/g, tandis que la teneur la plus faible est de 95,3 µg/g avec l'échantillon BP1 et la teneur la plus forte de 194,7 µg/g avec l'échantillon BP2. Dans l'ensemble des échantillons, le β-tocophérol représente le tocophérol majoritaire. Cependant si dans l'échantillon BP 3, l'α-tocophérol et le β-tocophérol sont dans les mêmes proportions, l'α-tocophérol est le tocophérol majoritaire dans l'échantillon BP13 alors que le β-tocophérol est pratiquement inexistant.

Tableau III 7 : Composition en tocophérols des différents beurres de *P. butyracea* (µg/g)

ID	α- tocophérol	β- tocophérol	γ- tocophérol	δ- tocophérol	Total
BP 1	29,9 ± 0,7	50,4 ± 0,5	5,0 ± 0,4	10,0 ± 0,7	95,3
BP 2	53,4 ± 1,1	107,2 ± 0,6	7,2 ± 0,3	26,9 ± 2,2	194,7
BP 3	46,3 ± 0,8	40,8 ± 0,4	6,5 ± 0,8	17,0 ± 0,1	110,6
BP 4	32,8 ± 0,2	71,9 ± 1,1	3,9 ± 0,2	16,2 ± 0,5	124,8
BP 5	50,8 ± 0,4	80,4 ± 0,6	8,0 ± 0,2	20,5 ± 1,7	159,7
BP 6	51,2 ± 0,5	106,8 ± 1,0	4,0 ± 0,5	12,8 ± 1,8	174,8
BP 7	37,1 ± 0,6	58,3 ± 1,1	4,6 ± 0,9	33,1 ± 1,5	133,1
BP 8	34,5 ± 0,8	44,8 ± 1,6	5,3 ± 0,5	17,8 ± 1,8	102,4
BP 9	47,3 ± 0,6	93,5 ± 1,1	3,8 ± 0,7	24,9 ± 2,7	169,5
BP 10	45,1 ± 0,6	85,0 ± 2,7	7,5 ± 0,4	30,6 ± 0,5	168,2
BP 11	31,7 ± 0,3	72,6 ± 0,6	7,8 ± 0,4	23,1 ± 0,6	135,2
BP 12	29,2 ± 0,5	65,9 ± 1,2	7,8 ± 1,0	23,2 ± 1,1	126,1
BP 13	96,7 ± 0,7	8,5 ± 0,2	17,8 ± 0,6	13,2 ± 1,2	136,2

I.1.8- Caractérisation physique

I.1.8.1- Teneurs en solide des différents beurres de *P. butyracea* par RMN

Le Tableau III 8 donne les valeurs obtenues de la détermination de la teneur en solide par RMN à différentes températures pour les beurres étudiés, ce qui permet d'obtenir la Figure III 3.

Des valeurs obtenues, on observe que le beurre de cacao pour une teneur en solide de 95 % à 0° conserve 75% de sa teneur en solide à 25°C puis cette teneur en solide chute brusquement et devient presque nulle à 37°C.

Tableau III 8 : Teneur en solide des différents beurres étudiés (%)

	0°C	25°C	37°C	41°C
BP 1	88	39	24	0
BP 2	88	33	19	0
BP 3	91	42	30	0
BP 4	78	23	15	0
BP 5	79	31	19	0
BP 6	84	30	15	0
BP 7	88	36	22	0
BP 8	90	36	21	0
BP 9	76	35	19	0
BP 10	82	30	14	0
BP 11	81	29	10	0
BP 12	88	35	19	0
BP 13	73	25	8	0
BK	36	17	2	0
BC	95	72	1	0

Cette fusion brusque est la propriété remarquable du beurre de cacao utilisée dans le chocolat. Quand on observe les résultats obtenus dans le cas des différents beurres de *P. butyracea*, on remarque que la teneur en solide à 0°C varie entre 73 et 91%, cette teneur en solide diminue pour atteindre des valeurs comprises entre 25 et 42% soit une perte de plus de 60% à 25°C. Les échantillons ayant une forte teneur en SOS (une teneur en SOO faible), ont une teneur en solide élevée ce contrairement aux échantillons de BP13 (73% à 0°C) et BP 9 (76% à 0°C). L'acidité des échantillons incriminés est certainement le facteur explicatif de cette différence.

La variation linéaire de cette teneur en solide entre 0 et 25°C, laisse entrevoir une fusion étalée du beurre de *P. butyracea*. Le beurre de karité analysé présente une teneur en solide faible (40% à 0°C) et une évolution très différente bien que sa composition soit très proche de celle du Beurre de *P. butyracea*. La différence observée dans cette étude serait certainement due à la différence de structure cristalline des beurres étudiés. En effet la structure cristalline des beurres résulte de la composition du beurre en triacylglycérols, de l'organisation spatiale des chaînes aliphatiques contenues dans les molécules lipidiques et de l'empilement en strates des molécules de triacylglycérols (Cansell, 2005 ; Timms, 1984 ; Small, 1986).

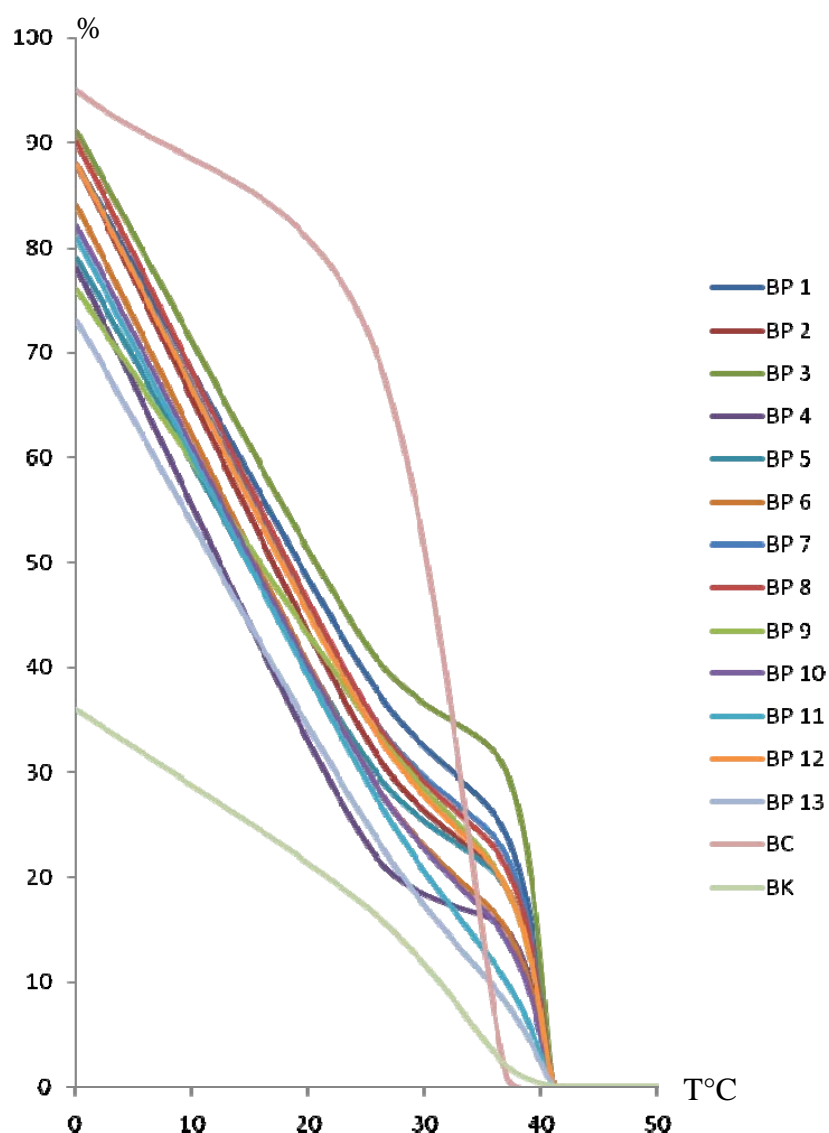


Figure III 3 : Evolution de la teneur en solide obtenue par RMN des différents beurres étudiés en fonction de la température

I.1.8.2- Etude du profil de fusion et de la teneur en solide obtenu par DSC

I.1.8.2.1- Profil de fusion

La mesure par DSC des plages de fusion permet d'observer le comportement des beurres soumis à la chaleur et d'apprécier au mieux les observations effectuées lors de la détermination de la teneur en solide des différents beurres, bien que les paramètres physiques mesurés soient différents. Elle permet de mettre en évidence des différences significatives dans la structure cristalline des échantillons étudiés. Ainsi, le profil de fusion du beurre de *P. butyracea* présente deux pics alors qu'on observe un pic sur les thermogrammes obtenus pour les beurres de karité et de cacao (Figure III 4). Le premier pic pour les différents beurres de *P. butyracea* est observé entre 10 et 25°C, alors que le second se trouve entre 30°C et 41°C. Ces pics atteignent leur maximum respectivement dans les intervalles [18,2-21,3] et [37,1-39,4] (Tableau III 9). Les différentes températures du second pic matérialisant la fusion complète des différents échantillons de beurre de *P. butyracea* sont plus élevées que ceux des beurres connus à savoir le beurre de karité (35,9°C) et le beurre de cacao (33,4°C). L'observation des différentes énergies (Tableau III 9) de fusion montre que l'échantillon BP 4 présente la plus grande énergie (35,4 J/g) pour le premier pic avec une forte teneur en SOO alors que l'échantillon BP 3 présente la plus grande énergie (96,7 J/g) pour le second pic de fusion avec sa concentration en SOS plus grande, ce qui laisse penser que ces pics de fusion sont intimement liés aux teneurs en SOO et SOS (Tableau III 5). Ces différentes observations permettent de mettre en relief la différence de formes cristallines entre le beurre de *P. butyracea* et les autres beurres étudiés.

Tableau III 9 : Température et énergie de fusion des différents beurres étudiés

ID	Température (°C)		Energie de Fusion (J/g)	
	Tf ₁	Tf ₂	ΔH_1	ΔH_2
BP 1	19,3	38,8	27,8	87,9
BP 2	18,4	36,8	33,3	70,2
BP 3	19,8	39,1	25,0	96,7
BP 4	21,1	37,1	35,4	56,3
BP 5	21,2	39,5	26,2	80,6
BP 6	21,0	39,1	27,0	77,1
BP 7	21,2	38,9	26,5	78,8
BP 8	21,4	39,7	27,9	68,9
BP 9	19,8	39,4	26,3	83,4
BP 10	21,3	39,1	25,5	79,5
BP 11	21,1	39,1	31,8	77,9
BP 12	20,2	39,0	30,0	78,2
BP 13	18,2	37,2	19,7	68,5
BK	-	35,9	-	67,9
BC	-	33,4	-	108,5

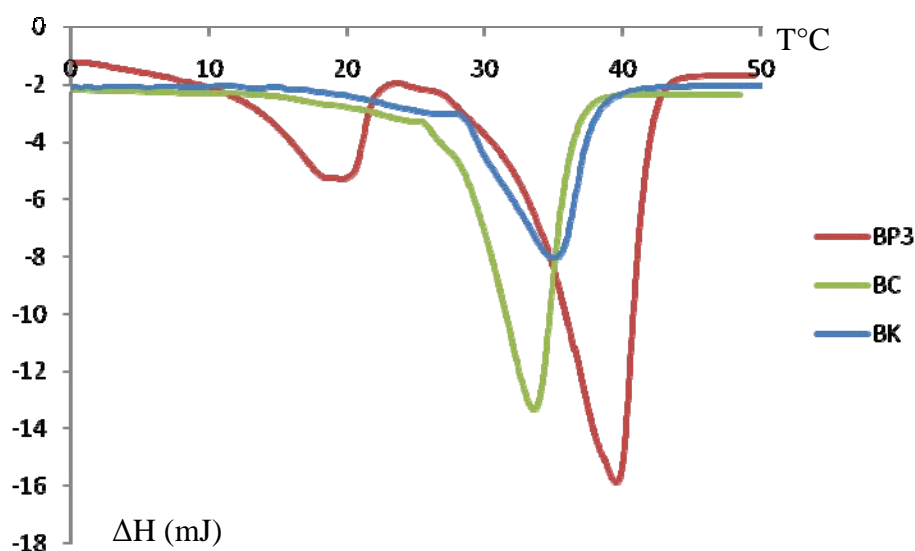


Figure III 4: Thermogrammes comparés d'un échantillon de *P. butyracea* et des autres beurres étudiés

I.1.8.2.2- Teneur en solide par DSC et comparaison avec les valeurs obtenues par RMN

Des résultats obtenus pour la teneur en solide par DSC des différents beurres de *P. butyracea*, on constate que la teneur en solide à 0°C varie entre 98 et 100%, cette teneur en solide diminue pour atteindre des valeurs comprises entre 52 et 76% soit une perte de plus de 30 à 40% à 25°C. A 37°C, la teneur en solide est encore de 30%. Quant au beurre de karité sa teneur en solide est 45% de sa valeur à 25°C pour atteindre 10% à 37°C (Tableau III 10).

Les teneurs en solide représentées sur la Figure III 5 montrent que le beurre de *P. butyracea* présente deux modes de fusion, une partie linéaire entre 0 et 25°C et une chute progressive de 25 et 41°C. Cependant, elle met toujours en relief cette chute brutale dans le beurre de cacao entre 25 et 37 °C.

En comparant les valeurs obtenues par DSC avec celles de la RMN, on remarque qu'elles sont plus élevées. Cette observation trouve sa source dans le mode de mesure de la teneur en solide des différents appareils, la RMN mesure le temps de relaxation des protons des triacylglycérols dans les différentes phases liquide et solide, tandis que la DSC se base sur la mesure des enthalpies de fusion de ces mêmes triacylglycérols. En essayant d'établir un rapport entre ces différentes valeurs DSC et celle RMN, on remarque dans le cas du beurre de karité et du beurre de cacao que les valeurs sont linéairement dépendantes alors qu'elles ne le sont pas pour le beurre de *P. butyracea* (Figure III 6). Lambelet (1986) avait établi cette linéarité entre la teneur en solide déterminée par RMN et celle obtenue par DSC du beurre de cacao.

Cette différence serait liée à la différence de forme cristalline des différents beurres utilisés.

La particularité du beurre de cacao réside dans sa composition marquée par la présence d'un seul triacylglycérol majoritaire le 2-oléyl-palmitostéarine. Cependant la différence entre les beurres de *P. butyracea* et de karité serait due à la présence d'acides gras polyinsaturés dans le beurre de karité.

Tableau III 10 : Teneur en solide des différents échantillons des Beurres étudiés par DSC (%)

Echantillons	0°C	25°C	37°C	41°C
BP 1	99	71	31	1
BP 2	99	61	25	0
BP 3	99	76	37	2
BP 4	98	57	15	0
BP 5	99	72	46	7
BP 6	100	75	41	5
BP 7	100	73	47	8
BP 8	100	70	45	8
BP 9	100	75	48	4
BP 10	100	73	44	6
BP 11	100	72	45	7
BP 12	100	71	42	5
BP 13	99	63	22	1
BC	98	84	1	0
BK	98	45	7	0

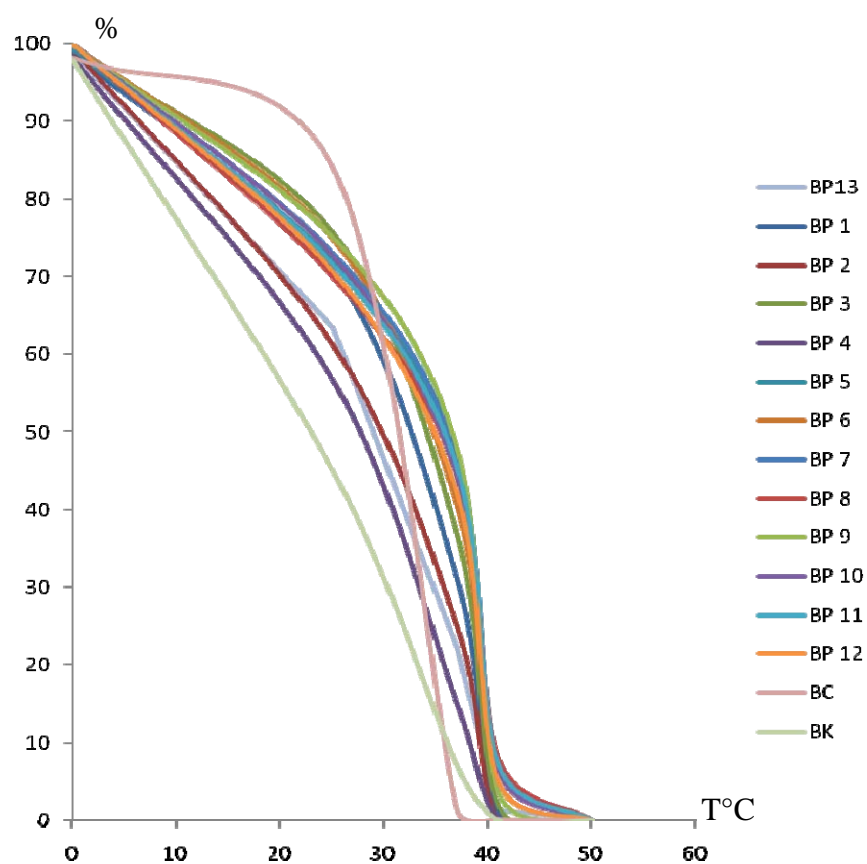


Figure III 5 : Evolution de la teneur en solide obtenue par DSC des différents beurres étudiés en fonction de la température

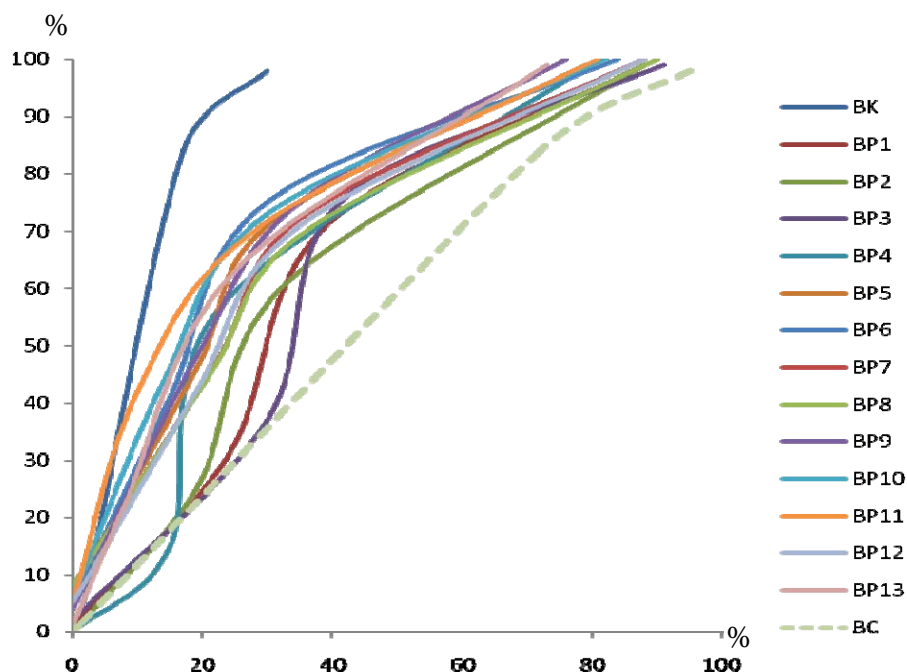


Figure III 6 : Courbes de la variation de la teneur en solide par DSC en fonction de la teneur en solide par RMN

I.2- Caractérisation des tourteaux délipidés de *P. butyracea*

I.2.1- Analyse de la teneur en fibre

Les tourteaux de plantes oléagineuses sont habituellement utilisés en alimentation animale. Ils constituent généralement une source importante de la ration alimentaire des animaux. Leur teneur en fibres digestives et en protéines est essentielle et doit être prise en considération pour obtenir un équilibre alimentaire satisfaisant. Le Tableau III 11 donne les résultats de la détermination des constituants pariétaux en fonction de la teneur en matières sèches dans les amandes délipidés de *P. butyracea*. Il ressort du tableau que les différents échantillons contiennent en moyenne 90% de matières sèches. La teneur en fibres totales est de 40% en moyenne (NDFs) sauf pour l'échantillon BP13 dont la teneur en fibre est de 66%. Les valeurs obtenues pour l'ADF comprise entre 23,1 et 50,3 sont très élevées traduisant un produit très cellulosique. Par ailleurs, la teneur en lignine ADL (faible) est très variable selon les différents échantillons est certainement due aux conditions environnementales subies par les graines.

Ainsi les différents échantillons présentent une teneur en cellulose vrai de 20% en moyenne, 5% de lignine et 12% d'hémicellulose. La teneur en cellulose est proche de celle rencontrée dans les tourteaux d'autres oléagineux tels que ceux de colza, de tournesol (Evrard, 2005), de *Canarium* (Agbo N'zi et al., 1992) et de karité, mais plus élevée que celle obtenue des graines de *P. butyracea* de côte d'ivoire (5,7%) (Kouadio et al., 1990). La teneur en matière minérale varie entre 3,5 et 5 % et est comparable à celle rencontrée dans les tourteaux d'arachide, de soja et de coton (Lusas and Hernandez, 1997).

Ainsi la teneur élevée en cellulose et en lignine dans certains échantillons réduisent la digestibilité et l'utilisation métabolique des protéines de tourteaux de *P. butyracea* chez les monogastriques (porcs et volailles). Toutefois chez les ruminants, la digestibilité est possible grâce à la constitution de leur tube digestif (Djago et al., 2007, Evrard, 2005).

Tableau III 11 : Teneur en fibres des amandes délipidées de *P. butyracea* (%)

ID	MS	MMs	NDFs	ADFs	ADLs	hemicellulose	Cellulose	lignine
BP1	92,7	4,2	42,4	33,9	14,9	8,5	19,0	10,8
BP2	92,8	4,8	35,6	27,8	7,6	7,7	20,2	2,7
BP3	93,0	4,6	35,4	24,0	4,7	11,4	19,3	0,1
BP4	93,3	4,0	34,6	23,1	5,0	11,5	18,1	1,0
BP5	92,6	4,2	44,2	34,1	12,9	10,1	21,2	8,7
BP6	92,7	3,9	36,9	23,2	6,8	13,8	16,4	2,9
BP7	92,8	3,4	37,4	21,4	5,2	16,0	16,2	1,8
BP8	91,7	4,5	44,0	33,0	13,3	10,9	19,8	8,8
BP9	91,7	4,1	41,7	31,3	11,1	10,4	20,2	7,0
BP10	92,6	4,2	40,1	22,6	4,4	17,5	18,2	0,2
BP11	93,3	3,5	42,1	32,3	14,2	9,8	18,2	10,6
BP12	91,7	4,0	37,2	27,6	8,1	9,7	19,4	4,1
BP13	87,1	4,6	66,1	50,3	26,5	15,8	23,8	21,9

I.2.2- Composition en minéraux et éléments majeurs

La composition en minéraux est identique dans les différents échantillons étudiés et représente environ 3% de la composition des tourteaux délipidés. Cette teneur est supérieure à celle obtenue par Kouadio et al., (1990) sur les graines récoltées en Côte d'Ivoire. Les tourteaux de *P. butyracea* contiennent 4 éléments minéraux que sont le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg). On constate une homogénéité dans la teneur des différents minéraux, qui est du même ordre de grandeurs dans les différents échantillons. Le potassium constitue l'élément minéral le plus abondant avec 50 à 75% des minéraux totaux identifiés. La teneur en calcium et en phosphore est très faible

comparativement à celle contenue dans les tourteaux de soja, de tournesol et de colza (Evrard, 2005). Les teneurs en calcium et de potassium sont proches de celles rencontrées dans les graines de *Canarium* (Agbo N'zi et al., 1992).

La teneur en azote des tourteaux déterminée par la méthode de Dumas varie de 1 à 1,6% de matière sèche, ce qui représente environ une teneur en protéine comprise entre 7 et 10% et représente le double de celle obtenue par Kouadio et al. (1990). Cette teneur en protéine est très faible devant celle contenue dans les tourteaux de soja (36 – 53%), d'arachide (26 – 42%), de coton (28 – 50%) (Lusas and Hernandez, 1997), de colza (34%) et de tournesol (30-35) (Evrard, 2005), mais semblable à celle des tourteaux de *Canarium* (Agbo N'zi et al., 1992) .

Tableau III 12 : Teneur en minéraux et éléments majeurs des amandes délipidés de *P. butyracea* (% MS)

ID	P	K	Ca	Mg	Minéraux totaux	N	Teneur en Protéines
BP 1	0,2	1,3	0,3	0,4	2,2	1,2	7,5
BP 2	0,2	1,5	0,2	0,4	2,3	1,3	8,1
BP 3	0,2	1,4	0,1	0,3	2,0	1,3	8,1
BP 4	0,2	1,3	0,1	0,4	2,0	1,4	8,7
BP 5	0,2	1,4	0,1	0,4	2,1	1,6	10
BP 6	0,2	1,2	0,1	0,3	1,8	1,1	6,9
BP 7	0,2	1,0	0,2	0,3	1,7	1,2	7,5
BP 8	0,2	1,5	0,2	0,5	2,4	1,4	8,7
BP 9	0,2	1,4	0,1	0,4	2,1	1,5	9,4
BP 10	0,2	1,4	0,1	0,3	2,0	1,2	7,5
BP 11	0,2	1,0	0,2	0,4	1,8	1,4	8,7
BP 12	0,2	1,2	0,2	0,4	2,0	1,6	10
BP 13	0,1	1,4	0,2	0,3	2,0	1,5	9,4

I.2.3- Composition en sucres

Les résultats de la composition en sucres montrent la présence de glucose, de fructose et de saccharose. Les différents échantillons présentent des teneurs assez variées en sucres mais faible car de l'ordre 328 à 636 µg/g ; seul l'échantillon BP13 présente une concentration presque nulle en sucres. L'observation de ces résultats montre qu'on a assisté à une hydrolyse du saccharose.

Tableau III 13 : Composition en glucides des amandes délipidées de *P. butyracea* (µg/g)

ID	Glucose	Fructose	Saccharose
BP 1	266	226	14
BP 2	153	126	116
BP 3	133	127	68
BP 4	229	191	216
BP 5	309	285	16
BP 6	257	192	26
BP 7	151	145	73
BP 8	287	201	33
BP 9	319	253	11
BP 10	118	65	4
BP 11	144	166	64
BP 12	225	205	58
BP 13	7	8	0

I.2.4- Teneur en polyphénols totaux

Les composés phénoliques sont d'intérêt croissant pour l'industrie alimentaire parce qu'ils retardent la dégradation oxydante des lipides et améliorent de ce fait la qualité et la valeur nutritive des aliments (Wojdyło et al., 2007).

Ces propriétés ont été mis en évidence par de nombreux tests effectués in vitro (Silva et al., 2007 ; Ou et al., 2001; Cao and Prior, 1999; Hirayama, et al., 1997; Re et al.,1999; Robards et al., 1999).

Les tourteaux de *P. butyracea* étudiés, contiennent 960 à 1520 µg d'acide gallique/g de tourteaux de composés phénoliques totaux. Cette teneur en composés phénoliques est comparable à celle rencontrée dans certaines graines de karité (Maranz et al., 2003) et dans certains fruits. Par contre, ces valeurs sont bien inférieures à la teneur des feuilles de thé qui sont 10 à 50 fois plus concentrées (Silva et al., 2007).

Tableau III 14 : Teneur en phénols totaux des amandes délipidées de *P. butyracea*

ID	µg d'acide gallique/g de tourteaux
BP1	1024,5
BP2	1325,5
BP3	1377,4
BP4	1492,4
BP5	1389,1
BP6	1521,7
BP7	1396,5
BP8	973,7
BP9	1092,0
BP10	1258,2
BP11	1253,6
BP12	1448,9
BP13	958,7

I.2.5- Composition en acides aminés

La qualité des protéines est évaluée au travers de la composition en acides aminés. Dans les tourteaux *P. butyracea*, dix huit acides aminés ont été identifiés, les acides aminés amidés, notamment la glutamine et asparagine sont quasi absents. La teneur en lysine est de 0,32% de la matière sèche soit 4,4% des protéines. La méthionine représente 0,16% de la matière sèche soit 2,2% des protéines et la cystéine 0,15% (2,1% des protéines) soit une teneur en acides aminés soufrés de 4,3%. La thréonine est dans une concentration comparable à celle de la lysine. Il faut noter que l'acide aminé majoritaire est l'acide glutamique. Ces résultats comparés avec ceux de la littérature (Lusas and Hernandez, 1997 ; Evrard, 2005) montrent que les tourteaux de *P. butyracea* sont très pauvres en protéines et particulièrement en acides aminés essentiels.

La teneur en protéine est faible ainsi que celle des éléments minéraux. Les tourteaux de *P. butyracea* ne sont aptes à rentrer à fort taux dans l'alimentation des monogastriques car la valeur énergétique est très faible. Cependant une bonne formulation peut permettre une incorporation en quantité limitée dans l'alimentation des porcs.

Toutefois ils présentent des atouts pour l'alimentation des ruminants et pour optimiser son utilisation, plusieurs paramètres sont à prendre en compte :

- Les variétés utilisées (si possible)
- La période de récolte
- Le traitement technologique
- Et le coût des formulations à effectuer

Tableau III 15 : Composition en acides aminés des amandes délipidées de *P. butyracea*

Acides aminés	Teneur % (g /100g)
Tryptophane	0,11
Cystéine	0,15
Acide aspartique	0,68
Méthionine	0,16
Thréonine	0,36
Sérine	0,34
Acide glutamique	1,13
Glycine	0,61
Alanine	0,38
Valine	0,45
Isoleucine	0,32
Leucine	0,50
Tyrosine	0,29
Phénylalanine	0,43
Histidine	0,18
Lysine	0,32
Arginine	0,62
Proline	0,26
Total	7,19

II- Biofaçonnement du Beurre de *P. butyracea* sabine : Synthèse d'un équivalent de Beurre de Cacao

La synthèse d'un équivalent de beurre de cacao à partir du beurre de *P. butyracea* par biofaçonnement nécessite l'incorporation de l'acide palmitique. L'incorporation peut se faire de deux manières par acidolyse ou par transestérification. L'incorporation dans le présent travail est exprimée par l'index palmitique définie par la relation

$$Pi = \frac{[POS] + 2[POP]}{2([POP] + [POS] + [SOS])}$$

par analogie à l'index stéarique défini par Bloomer et al (1990) et repris par Undurraga et al (2001). L'index stéarique considéré par ces deux auteurs est de 0,52 pour le beurre de cacao, ce qui donne un index palmitique de 0,48 pour le même beurre. Dans le cas de notre étude l'index palmitique du beurre de cacao étudié dans le chapitre sur la caractérisation est de 0,41.

II.1- Réaction d'acidolyse au moyen des lipases microbiennes

Elle s'effectue par action de l'acide palmitique sur le beurre de *P. butyracea* dans différents ratios. Le mélange réactionnel est fait dans un milieu hexanique et la réaction s'opère à 55°C pendant 24 heures. Des aliquotes sont analysés à des intervalles de temps bien déterminés pour le calcul des index palmitiques.

II.1.1- Acidolyse par la lipase de *Thermomyces lanuginosa*

La Figure III 7 donne l'évolution de l'index palmitique en fonction du temps pour différents rapports molaires au moyen de la lipase de *Thermomyces lanuginosa*. Au cours des 5 premières heures, l'incorporation de l'acide palmitique est régulière. La plus grande vitesse d'incorporation est obtenue pour le rapport molaire 2/1.

Après 24 heures, on constate que l'index palmitique évolue avec le temps. Les index obtenus varient de 0,06 à 0,20 ; les valeurs les plus élevées étant obtenues pour les ratios 3/1 (0,17) et 2/1 (0,20) tandis que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les ratios 1/2 (0,06) et 1/3 (0,06). Les résultats montrent que l'index palmitique diminue avec l'augmentation de la quantité d'acide palmitique. Cette inhibition de l'enzyme dans la

réaction d'acidolyse serait due au point de fusion élevé de l'acide palmitique (63,1°C). Ainsi la teneur maximale de POS produit au cours de ces différentes réactions d'acidolyse est de 18%, ce qui est très inférieure au taux de 40% de POS décrit par Undurraga et al (2001), de 39% de POS obtenu par Abigor et al (2003), et de 52 % de POS que contient l'échantillon de beurre de cacao étudié dans le présent travail.

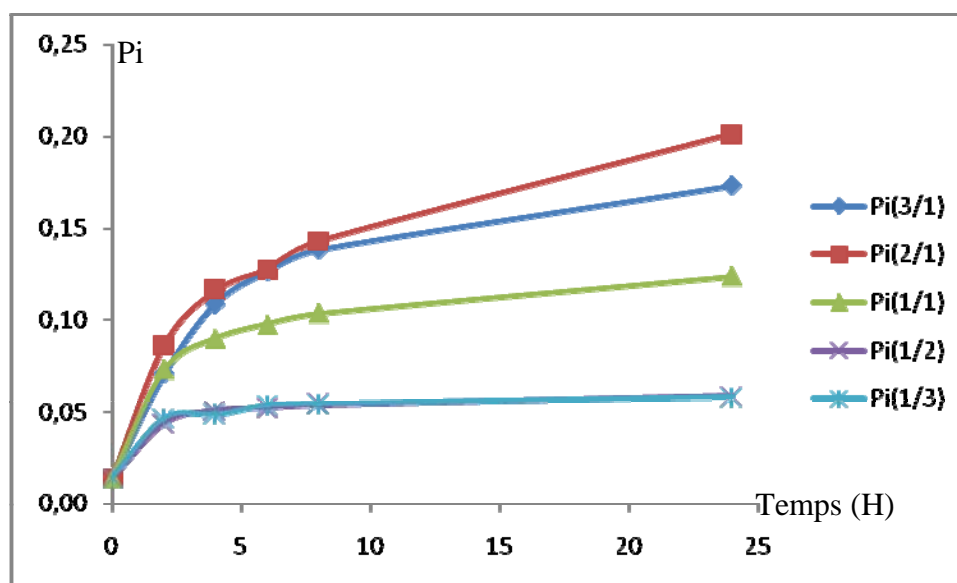


Figure III 7 : Evolution de l'index palmitique en fonction du temps à différents rapports molaire (Beurre de *P. butyracea*/acide palmitique) après catalyse à la lipase de *Thermomyces lanuginosa*

II.1.2- Acidolyse par la lipase de *Candida antarctica*

La Figure III 8 traduit, la courbe de l'évolution de l'index palmitique en fonction du temps. L'index palmitique est de l'ordre de 0,20 avec le ratio 3/1 mais ne dépasse pas 0,06 pour le ratio 2/1 et est pratiquement invariable par rapport à la valeur initiale (0,02) pour les autres ratios. On observe donc une incorporation importante d'acide palmitique dans le beurre au faible rapport molaire en acide palmitique. Les résultats de l'acidolyse en présence de la lipase de *Candida antarctica* confirment les observations faites plus haut dans le cas de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* à savoir qu'à forte concentration, l'acide palmitique devient un facteur limitant de la réaction d'incorporation.

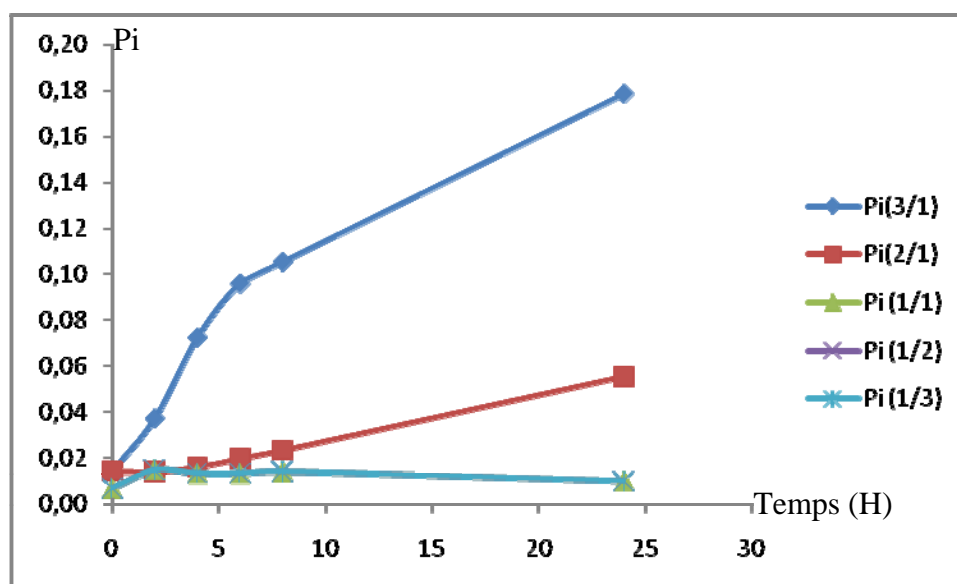


Figure III 8 : Evolution de l'index palmitique en fonction du temps à différents rapports molaire (Beurre de *P. butyracea*/acide palmitique) après catalyse par la lipase *Candida antarctica*

II.2- Réaction de Transestérification au moyen des lipases microbiennes

La transestérification est conduite dans les mêmes conditions de réaction que l'acidolyse mais le donneur d'acyle est le palmitate d'éthyle.

II.2.1- Transestérification par la lipase de *thermomyces lanuginosa*

La cinétique d'incorporation de l'acide palmitique dans le beurre par transestérification est représentée sur la Figure III 9. L'observation des différentes courbes montre qu'elles croient rapidement les 8 premières heures pour tendre vers un équilibre. De plus, la vitesse d'incorporation de l'acide palmitique augmente avec l'augmentation de la quantité de palmitate d'éthyle, l'index palmitique étant de 0,05, 0,10, 0,27, 0,40 et 0,57 respectivement pour les ratios 3/1, 2/1, 1/1, 1/2 et 1/3. Ainsi on atteint un index palmitique de 0,40 identique à celui du beurre de cacao pour les ratios 1/2 et 1/3 après respectivement 24 et 8 heures. Les teneurs en POS obtenues pour ces différents ratios est de 33,7 et 40 % (Tableau III 11). Cependant, on remarque encore la présence d'une forte quantité de SOO (20%), de POO (10%) et une faible quantité de POP (6,4 et 7,5). Pour lever cette contrainte, un fractionnement de l'huile avant la réaction paraît être nécessaire pour éliminer le SOO et donc empêcher la formation de POO dans la réaction.

Par ailleurs, en observant la Figure III 10, exprimant la variation des différents triacylglycérols en fonction du temps pour le rapport molaire 1/3 et en calculant les vitesses d'apparition et de disparition des différents triacylglycérols du mélange pour les 8 premières heures de réaction (Tableau III 12), on remarque que la production de POS ($V_m = 4,730$ mol/H) est liée à la disparition de SOS ($V_m = -5,717$ mol/H) alors que celle de POO ($V_m = 1,083$ mol/H) est liée à celle de SOO ($V_m = -1,165$ mol/H).

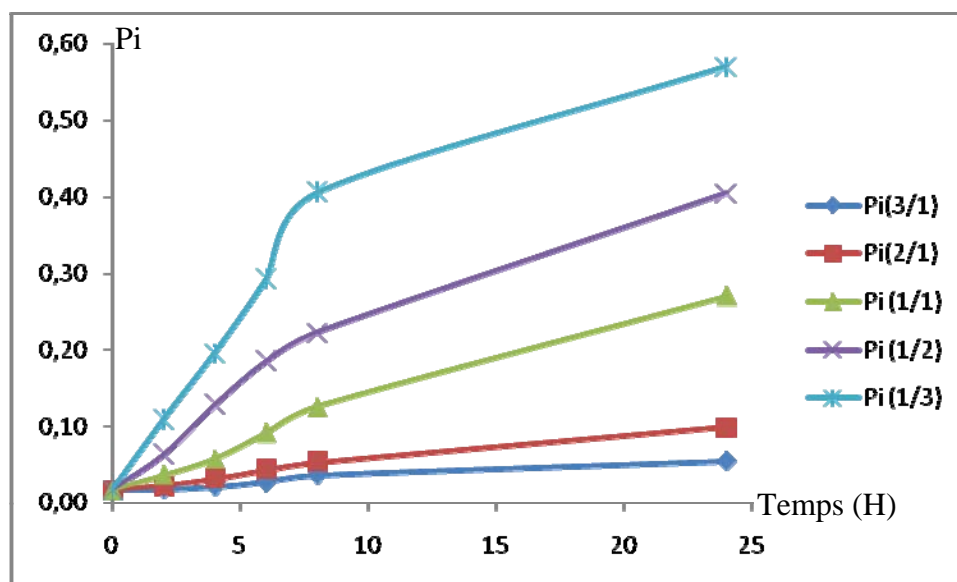


Figure III 9 : Evolution de l'index palmitique en fonction du temps à différents rapports molaires (Beurre de *P. butyracea*/ palmitate d'éthyle) après catalyse par la lipase de *Thermomyces lanuginosa*

Tableau III 16 : Composition des mélanges réactionnels ayant index palmitique proche de celui du beurre de cacao après catalyse par la lipase de *Thermomyces lanuginosa*

Triacylglycérols	TL (1/2) après 24H)	TL (1/3) après 8H
OOO	2,2	1,4
POO	11,2	9,0
POP	6,4	7,5
SOO	19,8	19,8
POS	33,7	40,0
SOS	17,3	20,4
AUTRES	9,5	1,9
Pi	0,40	0,40

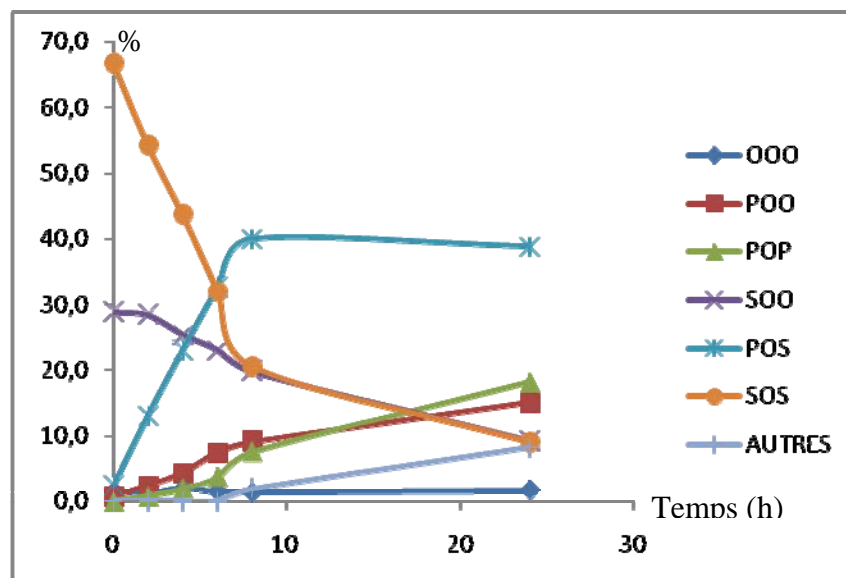


Figure III 10 : Evolution de la composition du milieu réactionnel en fonction du temps

Tableau III 17 : Vitesse d'apparition et de disparition des différents triacylglycérols lors de la réaction de transestérification au moyen de la lipase de *Thermomyces lanuginosa*

Triacylglycérols	SOS	SOO	OOO	POP	POO	POS
Vitesse (mol/H)	-5,717	-1,165	-0,012	0,894	1,083	4,730

II.2.2- Transestérification par la lipase de *Candida antarctica*

Dans les mêmes conditions que précédemment, les cinétiques d'incorporation de l'acide palmitique par transestérification par la lipase de *Candida antarctica* sont représentées sur la Figure III 11. Tout comme dans le cas de la lipase de *Thermomyces lanuginosa*, l'incorporation augmente avec la quantité de palmitate d'éthyle, toutefois on note qu'elle est plus élevée. En fin de réaction, les index sont respectivement de 0,17 ; 0,30 ; 0,41 ; 0,62 et 0,72 pour les ratios 3/1, 2/1, 1/1, 1/2 et 1/3. Cependant seuls les ratios 1/1, 1/2, et 1/3 donnent des index palmitiques comparables à celui du beurre de cacao respectivement après 24, 8 et 6 heures de réactions (Tableau III 18).

Bien que l'index soit égal à celui du beurre de cacao, les différents milieux réactionnels considérés ont une composition en triacylglycérols très différente de celle du beurre de cacao avec des teneurs en POS inférieures aux valeurs attendues (Tableau III 18). La présence d'une très grande quantité (15 à 40%), d'autres triacylglycérols (PPS, PSS, PPP) met en évidence l'absence de spécificité de la lipase de *Candida antarctica* dans cette réaction et limite ainsi son utilisation.

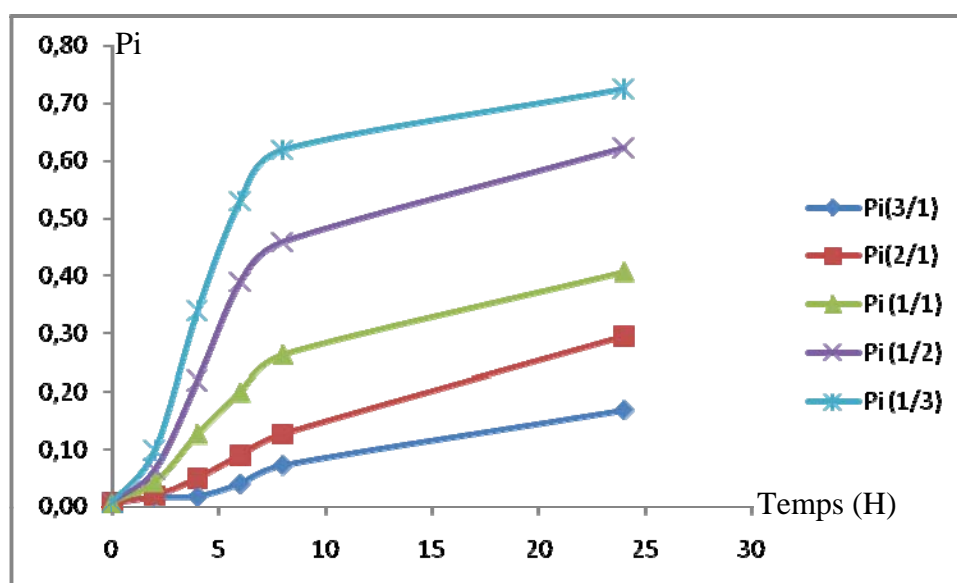


Figure III 11 : Evolution de l'index palmitique en fonction du temps à différents rapports molaires (Beurre de *P. butyracea*/palmitate d'éthyle) après catalyse par la lipase *Candida antarctica*

Tableau III 18 : Composition des mélanges réactionnels ayant un index palmitique proche de l'index du beurre de cacao après catalyse à la lipase de *Candida antarctica*.

Triacylglycérols	TL (1/1) après 24H	TL (1/2) après 8H	TL (1/3) après 6H
OOO	3,0	0,8	1,0
POO	10,2	10,0	9,5
POP	5,0	13,4	17,9
SOO	20,5	14,3	10,1
POS	31,5	27,2	23,0
SOS	14,6	18,3	14,7
AUTRES	15,3	16,2	23,9
Pi	0,41	0,46	0,53

II.3- Obtention de la stéarine de *P. butyracea* après fractionnement du beurre

Les études précédentes ont montré que le SOS (stéarine de *P. butyracea*) était le substrat par excellence de la lipase pour la synthèse de POS et de POP. Ainsi, un fractionnement du beurre est nécessaire pour obtenir une fraction plus riche en SOS.

Pour atteindre cet objectif, un fractionnement liquide à l'hexane est conduit à 0°C avec différentes quantités de solvant afin d'obtenir la meilleure fraction à exploiter. Les fractions F1, F2, F3, F4, F5, et F'1, F'2, F'3, F'4, F'5, représentent respectivement les

fractions organiques et concrètes obtenues après mélange du beurre et du solvant dans des ratios avec 1/1, 1/2, 1/3, 1/5, 1/10 (p/p).

II.3.1- Composition en acides gras des différentes fractions

Les compositions en acides gras des deux fractions pour les différents mélanges effectués sont illustrées sur les Figures III 12 et III 13. L'observation de ces différentes courbes révèle la présence de quelques acides gras : acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique. De plus, l'acide oléique représente le constituant majeur de toutes les fractions organiques et sa concentration passe de 49,4% dans le beurre initial pour atteindre une valeur comprise entre 60 et 68 %. Par ailleurs, la teneur en acide stéarique diminue jusqu'à 29%. Ainsi on observe une croissance de la teneur en acide oléique au fur et à mesure que le volume de solvant augmente.

Quant à la fraction solide, le phénomène observé est contraire à celui décrit dans la fraction organique. En effet, elle s'enrichit en acide stéarique et s'appauvrit en acide oléique. La teneur en acide stéarique atteint son taux le plus élevé dans la fraction F'5 (61%).

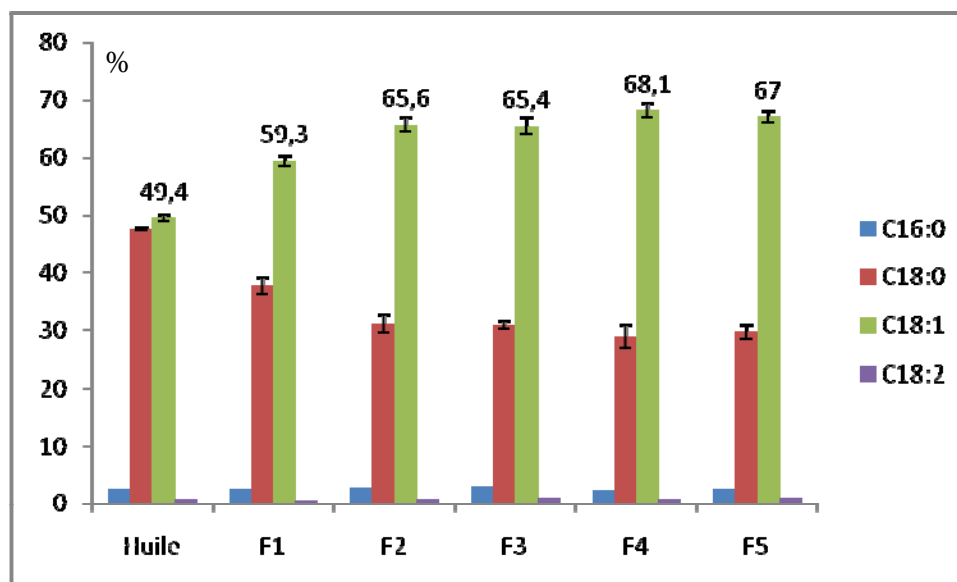


Figure III 12 : Composition en acide gras de la fraction organique lors du fractionnement du Beurre de *P. butyracea* en fonction du volume de solvant

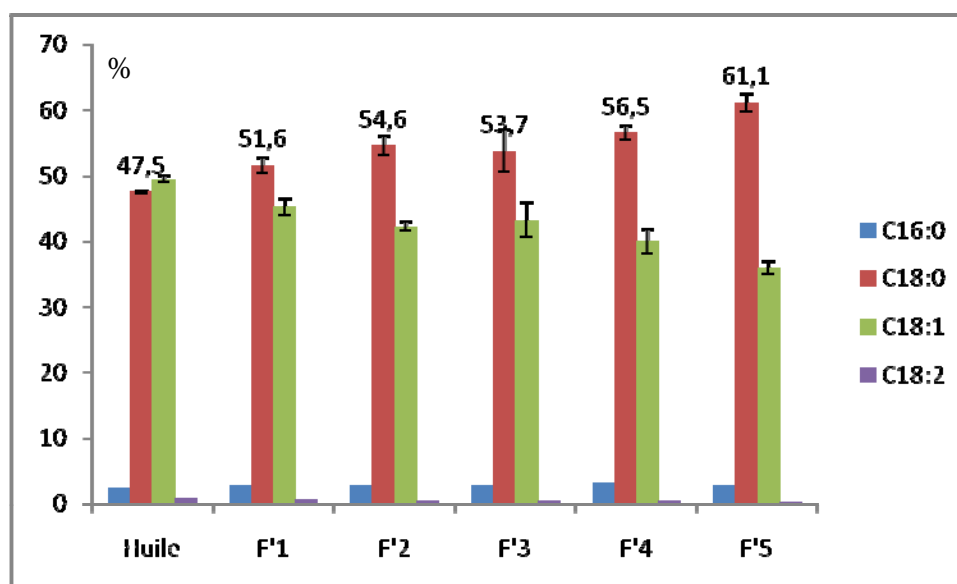


Figure III 13 : Composition en acide gras de la fraction concrète lors du fractionnement du Beurre de *P. butyracea* en fonction du volume de solvant

II.3.2- Composition en triacylgcérols des différentes fractions

Le fractionnement permet de séparer les triacylgcérols de l'huile en deux fractions l'oléine et la stéarine du beurre de *P. butyracea*.

L'oléine contenue dans la phase organique (Figure III 14) est essentiellement composée en majorité de SOO qui constitue 93% en moyenne des triacylgcérols quelque soit le volume d'hexane, et de la trioléine OOO (5%) ; par contre on observe la diminution de la teneur en SOS qui passe de 61,4% à 1%. Toutefois, la composition du mélange devient plus sélective avec l'augmentation du volume d'hexane ; ainsi au fur et à mesure que le volume d'hexane augmente les triacylgcérols rencontrés dans la phase organique sont insaturés.

La phase concrète quant à elle, s'enrichit en triacylgcérols monoinsaturés à savoir SOS, POS (Figure III 15). La composition en SOS et POS augmente avec le volume d'hexane tandis que celle de SOO diminue. En effet, la composition de SOS passe de 61,4 % dans l'huile native à 96,5% dans la phase concrète F5 où son plus grand taux est atteint. La teneur de SOO décroît de 35,8 % à 2% (Figure III 15).

Ce fractionnement met en évidence une prédominance des triacylgcérols polyinsaturés dans la phase organique tandis que les triacylgcérols de type SIS (saturé insaturé saturé) sont récupérés par la phase concrète.

Ces observations concordent avec les valeurs des températures de fusion des différents triacylgcérols.

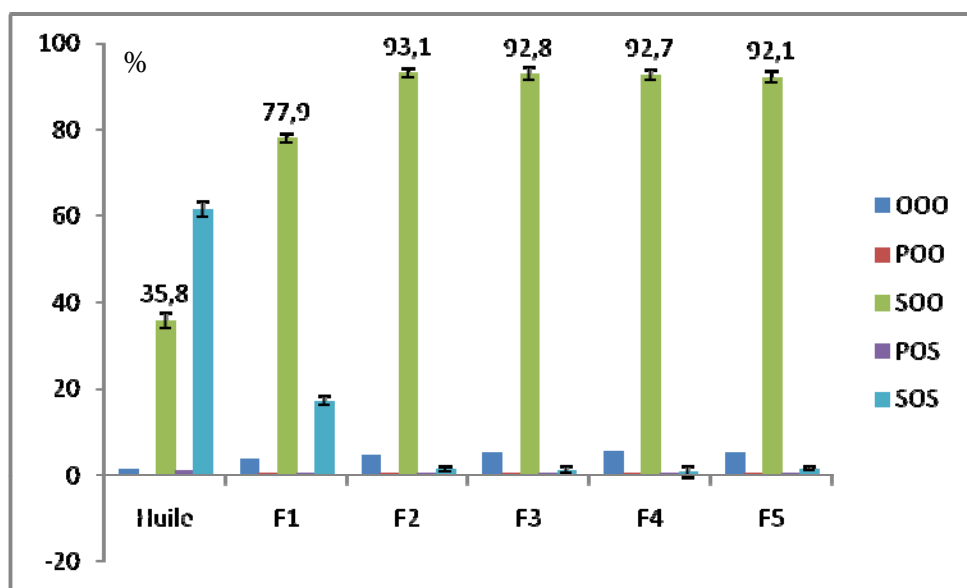


Figure III 14 : composition en triacylglycérols de la fraction organique lors du Fractionnement du beurre de *P. butyracea* en fonction du volume de solvant

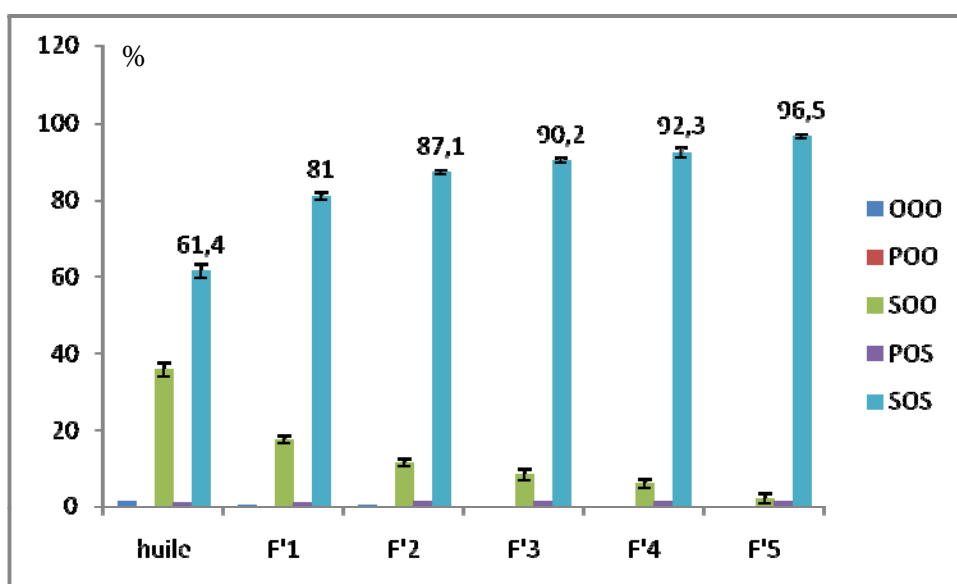


Figure III 15 : composition en triacylglycérols de la fraction concrète lors du Fractionnement du beurre de *P. butyracea* en fonction du volume de solvant

II.4- Transestérification de la stéarine

Sur la base des résultats obtenus ci-dessus les réactions effectuées dans ce paragraphe sont mises en œuvre entre la stéarine de *P. butyracea* et le palmitate d'éthyle avec un ratio de 1/3 et sont catalysées par la lipase de *Thermomyces lanuginosa*. La stéarine utilisée est celle contenant au moins 92% de SOS soit les fractions F'4 et F'5. Cependant l'influence de

certaines facteurs comme l'activité de l'eau, la quantité de lipase, la température, et la nature du solvant ont été évaluées.

II.4.1- Etude de l'influence de l'activité de l'eau

La quantité d'eau est un facteur important dont dépend le déplacement de la réaction de l'hydrolyse ou de l'estérification. Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à la l'activité de l'eau dans le biocatalyseur ; toutefois une quantité minimale d'eau est indispensable au maintien de l'enzyme dans sa conformation active. La Figure III 16 illustre l'évolution de l'index palmitique en fonction du temps à différentes a_w de la lipase variant de 0,05 à 0,75.

Ainsi à partir des résultats obtenus, on constate que la réaction d'incorporation est très sensible à l' a_w , et elle croît avec la diminution de l' a_w . Toutes les a_w conduisent à la synthèse d'au moins 40% de POS exception faite à l' $a_w = 0,75$ dont la teneur après 10 heures est de 30%. Ainsi on obtient des index palmitiques et des compositions semblables et correspondant de ceux du beurre de cacao après 8 heures de réaction pour l' $a_w = 0,05$ et après 10 heures pour les a_w de 0,23 et 0,15 (Tableau III 19). La réaction est donc déplacée vers l'estérification en milieu peu hydraté.

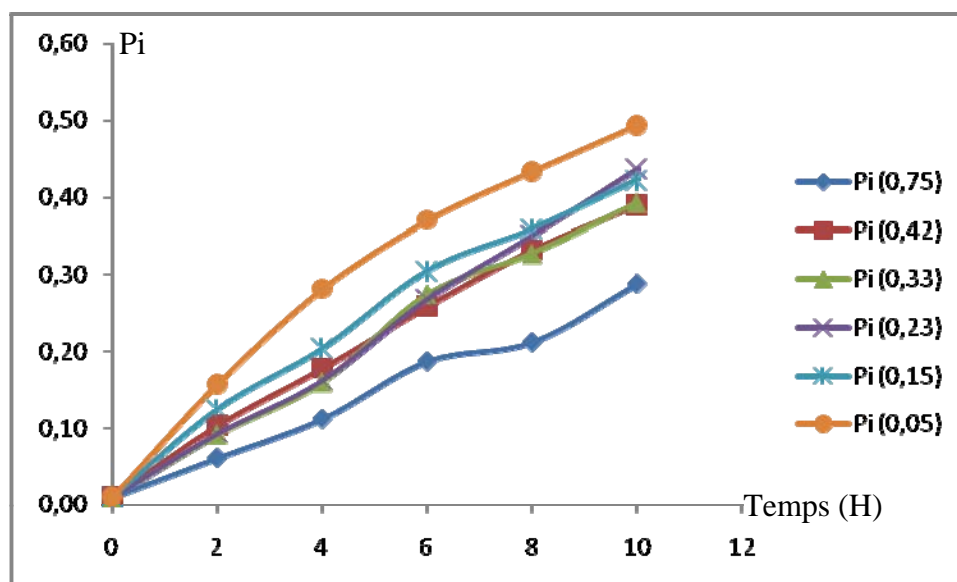


Figure III 16: Etude cinétique d'incorporation de l'acide palmitique (index palmitique) en fonction du temps sur la réaction de transestérification du beurre fractionné à différentes a_w de la lipase *Thermomyces lanuginosa*

Tableau III 19 : Composition des mélanges réactionnels ayant index palmitique proche de celui du beurre de cacao après catalyse par la lipase de *Thermomyces lanuginosa* à différentes activités de l'eau

Triacylglycérols	TL ($a_w = 0,23$) après 10H	TL ($a_w = 0,15$) après 10H	TL ($a_w = 0,05$) après 8H
POO	6,4	3,0	3,6
POP	10,4	12,5	11,4
SOO	6,5	5,8	5,9
POS	49,0	49,8	51,4
SOS	20,4	26,2	22,7
Autres	7,3	2,7	5,0
Pi	0,44	0,42	0,43

II.4.2- Caractérisation des produits de réaction (DSC)

La meilleure transestérification ayant été obtenue pour l' a_w de l'eau de 0,05, les triacylglycérols des différentes fractions séparées par chromatographie sur couche mince sont analysées par DSC pour évaluer l'influence de modification sur le beurre fractionné.

Au vu des résultats obtenus et consignés dans le tableau III 20, nous pouvons dire que l'incorporation de l'acide palmitique entraîne une diminution de la température de fusion et de l'énergie nécessaire à cette fusion. Ainsi on remarque que l'énergie de fusion baisse avec l'augmentation de la teneur en acide palmitique. Après 8 et 10 heures de réaction la température de fusion du mélange est respectivement de 33,5 et 33,2 pour une énergie de 106,5 et de 101,3 J/g.

La composition du mélange à 8 et 10 heures de réaction en plus de sa composition très proche du beurre de cacao, a une énergie de fusion et une température de fusion comparables à celle du beurre de cacao ($T_f = 33,4$ et $\Delta H = 108,5$ J/g). Cependant, on observe sur le thermogramme, une trainée de ces différents pics au delà de la température de 37°C.

Tableau III 20 : Température et Energie de fusion pour les milieux réactionnels à différents temps

ID	Tf (Température au sommet du pic en °C)	ΔH Energie de Fusion (J/g)
HF	41,9	147,4
HF(3102)	36,4	132,1
HF(3104)	37,2	130,2
HF(3106)	35,2	125,6
HF(3108)	33,5	106,5
HF(31 10)	33,2	101,3
BC	33,4	108,5

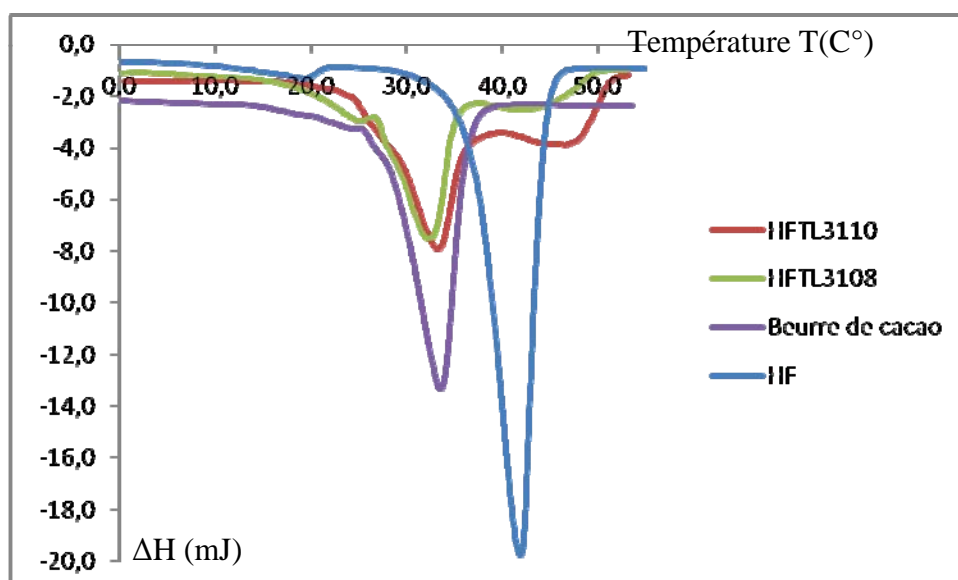


Figure III 17 : Thermogrammes comparés d'un échantillon du beurre de cacao, des différents beurres après 8 et 10 heures de modifications et du beurre fractionné

II.4.3- Etude de la variation de la quantité de lipase

La quantité de biocatalyseur est un facteur important pour la mise en œuvre des réactions enzymatiques. Ainsi une réaction enzymatique devrait utiliser au plus 10% de lipases. La composition du milieu réactionnel en principaux constituants du beurre de cacao (POP, POS, SOS) et l'index palmitique pour différentes quantités d'enzymes de 2, 5, 8 et 10% (p/p) sont représentés sur la Figure III 18.

L'index palmitique augmente avec la quantité d'enzyme, il est de 0,07, 0,18, 0,38 et 0,43 respectivement pour 2, 5, 8, 10% de lipase. Ainsi, les index obtenus pour 8% et 10% de lipase sont ceux correspondant à ceux du beurre cacao. La composition de ces deux milieux est de 47,1 % de POS, 30,5% de SOS et 9,9 de POP pour les 8% de lipase et 51,4% de POS, 22,7 % de SOS et de 11,4% de POP pour les 10%. L'utilisation de 8% de lipase pourrait permettre de diminuer le coût de la réaction.

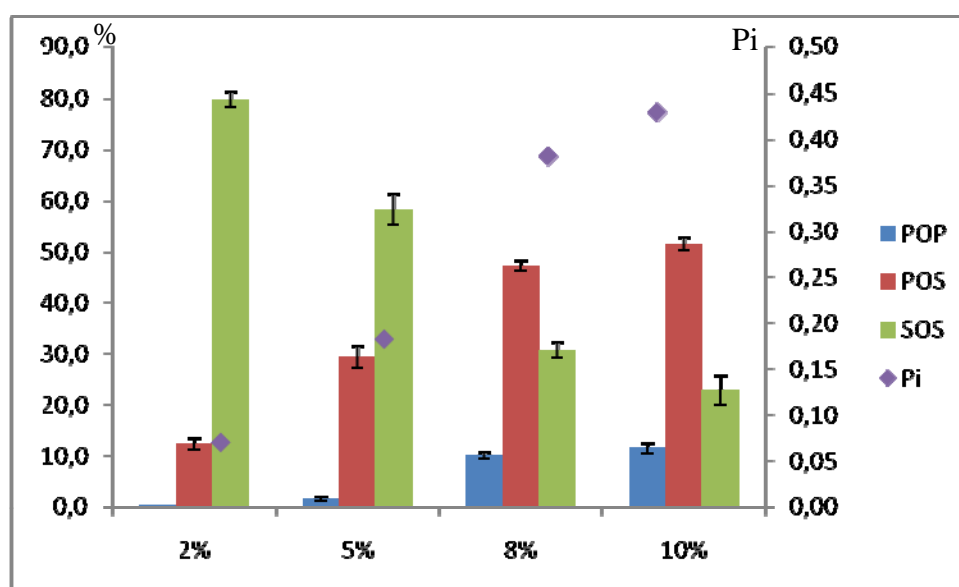


Figure III 18 : Etude de l'influence de la quantité de lipase sur la réaction de transestérification du beurre fractionné

II.4.4- Etude de variation de la température

L'influence de la température est vérifiée pour les températures comprises entre 30 et 60°C en présence de 10% d'enzyme et pendant 8 heures d'incubation. Les résultats sont présentés sur la Figure III 19. On remarque que l'incorporation de l'acide palmitique augmente avec la température. En effet l'index palmitique varie de 0,19 à 30°C pour

atteindre la valeur de 0,43 aux températures les plus élevées (55-60°C). Ainsi, les compositions des différents mélanges à 50, 55 et 60°C sont compatibles avec celles du beurre de cacao.

Ces résultats confirment les observations de Zhang et *al.* (2001) qui ayant utilisé la lipase de *Thermomyces lanuginosa* dans la synthèse des graisses pour margarine, ont obtenu une bonne synthèse aux températures de 50 à 60°C. De plus les travaux de Wang et *al.* (2006) ont montré que le taux d'incorporation augmente avec la température.

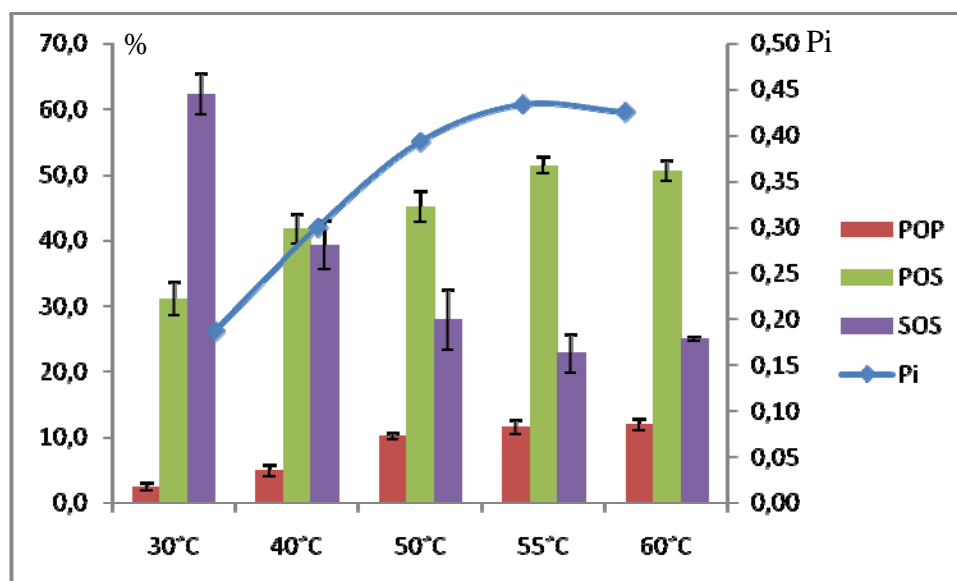


Figure III 19 : Etude de l'influence de la température sur la réaction de transestérification du beurre fractionné

II.4.5- Etude de la nature du solvant

La polarité ($\log P$) est un paramètre largement utilisé dans l'évaluation des liens entre l'activité enzymatique et les propriétés des solvants (Brink and Tramper, 1985 ; Laane et *al.* 1987, Soumanou et *al.*, 1998). L'effet de différents solvants ayant un \log de P variant de -0,2 à 4,5 sur l'activité de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* à une activité de l'eau de l'ordre de 0,05 dans la réaction de transestérification du beurre fractionné de *P. butyracea* a été étudié (Figure III 20). Des résultats obtenus, il ressort que dans l'acétone ($\log P = -0,2$) et l'isopropanol ($\log P = 0,07$) on obtient un index inférieur à 0,02 donc on assiste certainement à une inactivation de la lipase. Dans les autres solvants ($\log P > 2$), on obtient une bonne incorporation avec des mélanges répondant à la composition du beurre de cacao ($P_i \geq 0,40$). Ainsi, la chute de l'activité enzymatique observée dans l'acétone et dans

l'isopropanol pourrait s'expliquer par une altération de la conformation native de la lipase par la destruction des liaisons hydrogène, défavorisant ainsi les interactions hydrophobes.

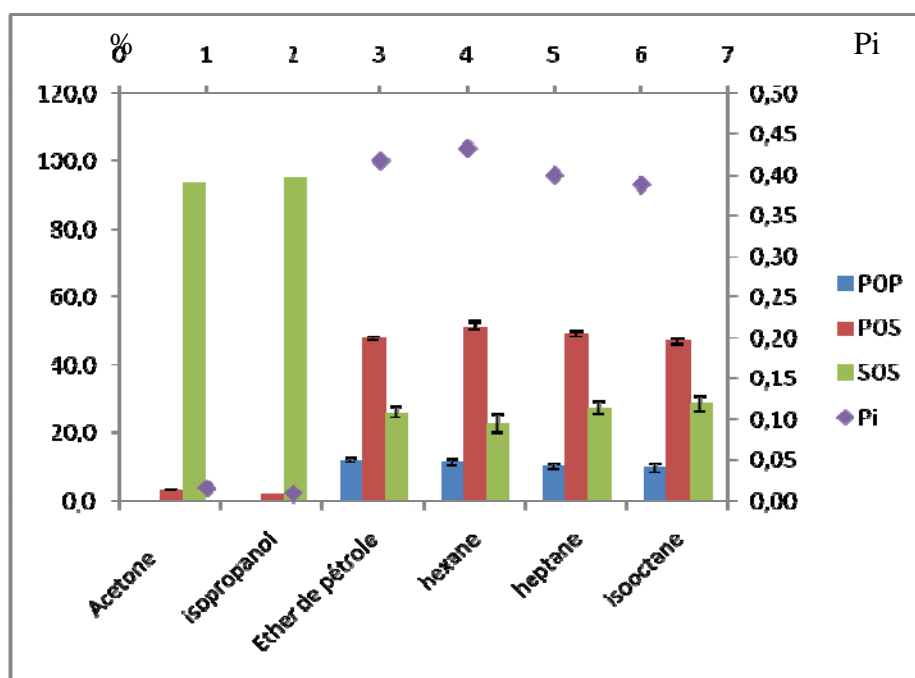


Figure III 20 : Etude de l'influence du solvant organique sur la réaction de transestérification du beurre fractionné

II.5- Application aux lipases végétales

L'activité lipasique du latex de papaye est connue et l'intérêt accordé à ces lipases réside dans leur application sans aucune purification particulière et à leur disponibilité. Dans cette étude, du latex de papaye récolté et lyophilisé a été utilisé dans la réaction de synthèse de l'équivalent de beurre de cacao. Cependant, la mesure de l'activité lipolytique et la stabilité du biocatalyseur ont été évaluées.

II.5.1- Activité lipolytique par pH-stat

Les valeurs de l'activité lipolytique obtenues lors de l'hydrolyse de l'huile d'olive par le latex de papaye lyophilisé et le latex de papaye commerciale sont reportées dans le Tableau III 15. Les résultats montrent que le latex de papaye lyophilisé présente une activité lipolytique de 85,1 U/mg. De plus, cette activité est supérieure à celle de la préparation commerciale de latex brute. Par conséquent, on peut effectuer une valorisation de ce latex dans des réactions d'hydrolyse des corps gras et même à l'échelle industrielle.

Tableau III 21 : Activité lipolytique comparée des lipases de Papaye *PB* et *PS*

	Papaye lyophilisée (PB)	Papaye commerciale (PS)
Activité lipolytique (μmol d'acide libéré/minutes/mg (U/mg))	$85,1 \pm 4,9$	$46,2 \pm 1,5$

II.5.2- Influence de l'environnement aqueux

Pour étudier l'influence de l' a_w sur les réactions de synthèses biocatalysées par la préparation de papaïne lyophilisée (PB) et de papaïne commerciale (PS), nous avons mis en œuvre, une réaction simple d'interestérification entre la trioléine (TAG) et la tricapriline (TAG) dans de l'hexane à 55°C, après 24 heures. Les préparations enzymatiques sont différemment hydratées ($0 < a_w < 1$). Les résultats sont répertoriés sur la Figure III 21. Les résultats montrent que l'activité biocatalytique est tributaire de l' a_w . Le rendement optimal est obtenu lorsque la préparation enzymatique lyophilisée est stabilisée à une a_w de 0,23. Quant à la préparation de papaïne commerciale, le rendement optimal est atteint à une a_w de 0,33. Néanmoins, le rendement est aussi très proche de la valeur maximale à l' a_w de 0,23.

Pour mieux expliquer ce phénomène nous nous sommes intéressés à l'étude du couple a_w /teneur en eau de la préparation lyophilisée, puisque l'hydratation du biocatalyseur ne dépend pas seulement de la teneur en eau. Ainsi l'isotherme de sorption de la préparation à 20°C comme indiqué dans les matériels et méthodes avec une DVS-1 a été déterminé.

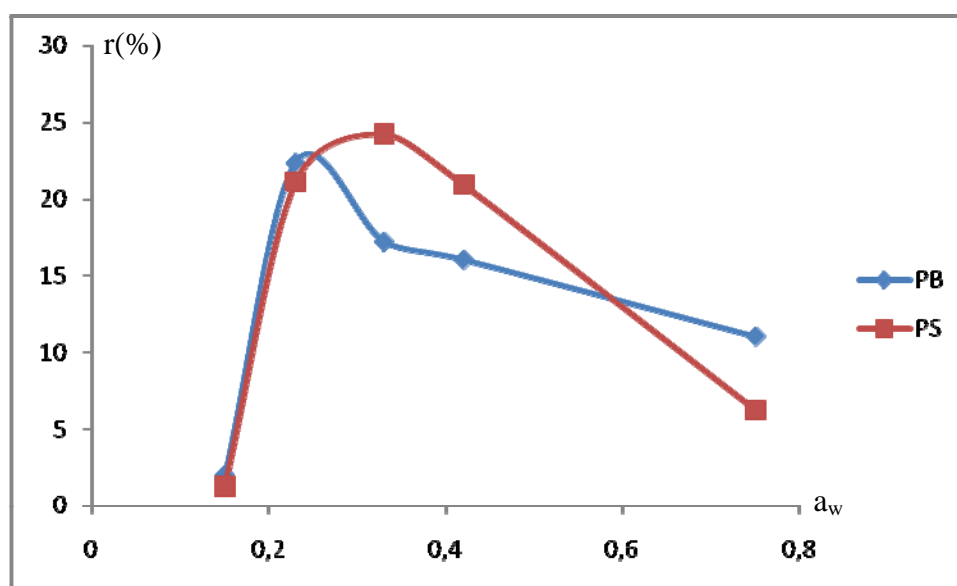


Figure III 21 : influence de l' a_w de l'eau sur le rendement des réactions de transestérification

La préparation enzymatique est hydratée jusqu'à une a_w de 0,95 lors de l'adsorption et ensuite suit la libération d'eau au cours de la désorption. La Figure III 22 donne les deux isothermes d'adsorption et de désorption de la papaine lyophilisée.

Les résultats montrent que la préparation est très hydrophile, puisqu'elle absorbe près de 70 g d'eau pour 100 g de matière sèche pour une a_w de 0,95. Ensuite, lorsque cette préparation est déshydratée, on observe une superposition des courbes de sorption et de désorption, ce qui correspond à une hystérèse presque nulle. L'hystérèse correspond à la différence entre la quantité d'eau adsorbée par l'enzyme et celle libérée après désorption pour une même a_w . Cette très faible hystérèse exprime une facilité de la préparation à relarguer l'eau qu'elle a précédemment adsorbée et la présence de très peu de changements irréversibles de conformation du biocatalyseur. Ces changements de conformation responsables de la modification de l'activité et la stabilité des lipases présentes dans cette préparation résultent du fait qu'après 80% d'humidité relative, les lipases de la préparation font partie des particules qui s'agglomèrent sous la forme d'un gel et ne pouvant pas retourner à la situation initiale.

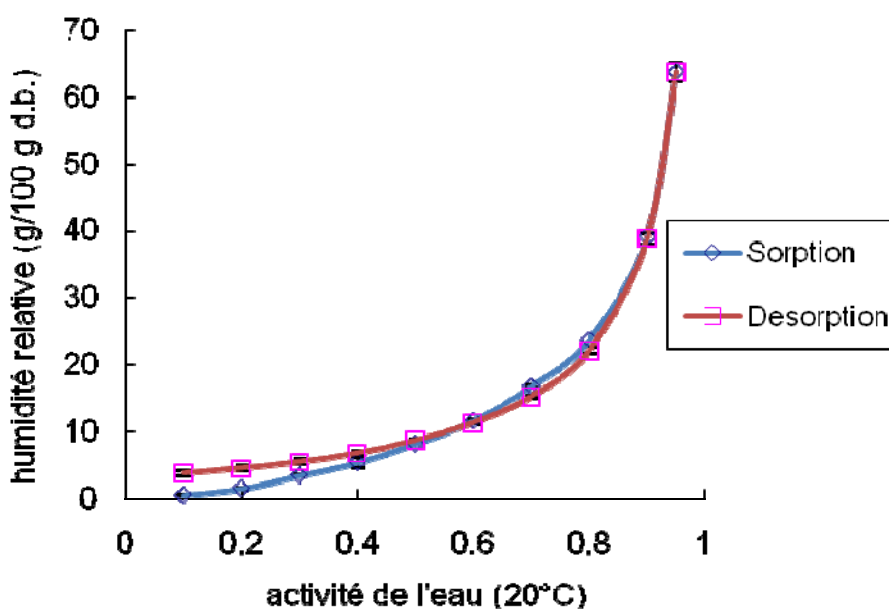


Figure III 22 : isothermes d'adsorption et de désorption en eau de la papaine lyophilisée

Sur la Figure III 23 est représentée d'une part l'isotherme et d'autre part la courbe indiquant l'évolution du rendement de la réaction interestérification biocatalysée en fonction

de l' a_w . Les résultats indiquent que l'état d'hydratation du biocatalyseur, régi par sa teneur en eau et son a_w , influence considérablement le rendement de la réaction biocatalysée.

Lorsque l' a_w est inférieur ou égale à 0,1, la préparation enzymatique est pulvérulente et sa teneur en eau est inférieure à 2%. L'eau se trouve liée au réseau protéique par liaison hydrogène sur des sites fortement polaires. Cette eau fixée, et en faible quantité, n'est pas suffisante pour assurer à la lipase une structure tridimensionnelle optimale. Ainsi, le rendement de l'interestérification est très faible. A 2% d'hydratation, c'est-à-dire à l' a_w de 0,23, la lipase est dans sa conformation tridimensionnelle active et la synthèse atteint son rendement maximal ; l'eau est liée au réseau protéique par des forces plus faibles que les liaisons hydrogènes précédentes (liaisons de Van der Waals).

Les résultats montrent qu'au-delà de cet état optimal d'hydratation pour la préparation de papaine, le rendement de la réaction biocatalysée diminue. L'eau de moins en moins liée par le réseau protéique de la préparation enzymatique devient un substrat compétitif pour la réaction inverse d'hydrolyse qui prend rapidement le pas sur la réaction de synthèse.

La réaction est donc favorable dans la partie linéaire de la courbe de sorption ($0,1 < a_w < 0,4$). Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par Caro et *al* (2002).

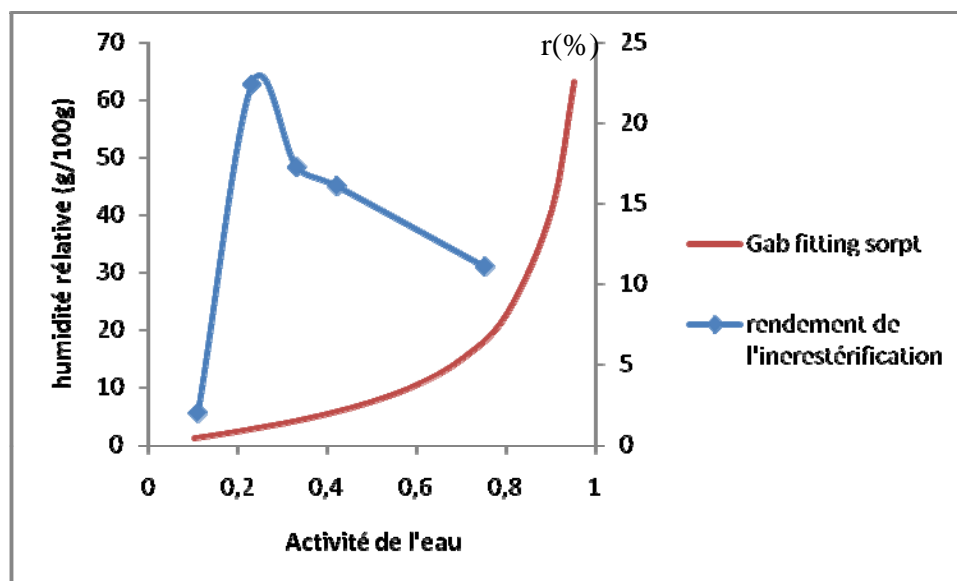


Figure III 23 : corrélation entre l'environnement aqueux et activité biocatalytique de la papaine lyophilisée

II.5.3- Utilisations des différentes lipases végétales dans la synthèse d'un équivalent de beurre de cacao

Les réactions ont été conduites en milieu hexanique avec un mélange beurre/palmitate d'éthyle ou huile fractionnée/palmitate d'éthyle dans un ratio 1/3 à 55°C avec les lipases de PB et PS équilibrées à une a_w de 0,23. Les aliquotes ont été prélevés après 8, 24, 48, 72 heures d'incubation pour être analysés en HPLC.

La Figure III 24 donne la variation de l'index palmitique en fonction du temps. On remarque que l'index augmente avec le temps, il augmente quand on passe de la lipase *PB* à *PS* et diminue avec l'utilisation du beurre fractionné. De cette étude, il ressort que la lipase *PS* est plus active en synthèse que la lipase *PB*. Les deux lipases sont d'autant plus actives dans le beurre tel quel que dans le beurre fractionné. Toutefois, après 72 heures de réaction, la teneur en POS maximale atteinte, est de 24% des triacylglycérols pour la réaction avec la lipase *PS* en présence du beurre et que l'index recherché n'est atteint dans aucune des réactions.

Pour améliorer l'incorporation, une nouvelle réaction est conduite avec un ratio de 1/5. Les résultats sont illustrés sur la Figure 2-18. Cette réaction confirme les observations faites plus haut. La lipase *PS* présente les index les plus élevés qui atteignent 0,53 après 72 heures de réaction. Cependant, la composition du mélange ne reflète pas celle du beurre de cacao puisqu'elle est formée de 9,1 % de POP, 26,1% de POS et de 17,1% de SOS pour un index de 0,42. Cette contre-performance de ces lipases pourrait être liée à la nature des acides gras à transestérifier. Ces résultats sont en accord avec les observations de Folgias et Villeneuve (1997) et Caro et *al.*, (2004) qui ont montré une affinité de la lipase de papaye pour les acides gras à courtes chaînes.

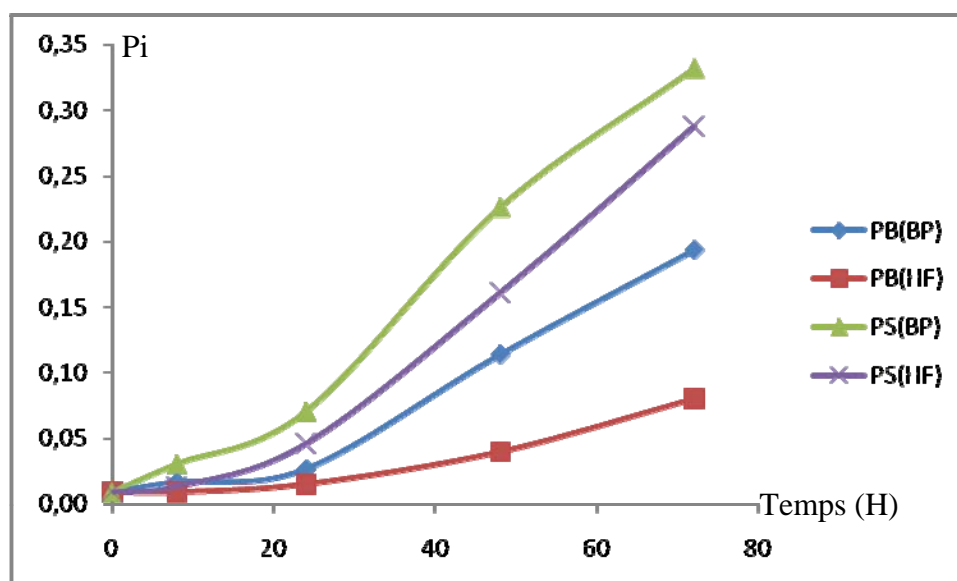


Figure III 24 : Evolution de l'index Palmitique en fonction du temps après catalyse à la lipase papaye PB et PS des différents mélanges beurre (BP)/palmitate d'éthyle ou huile fractionnée (HF)/ palmitate d'éthyle (ratio : 1/3)

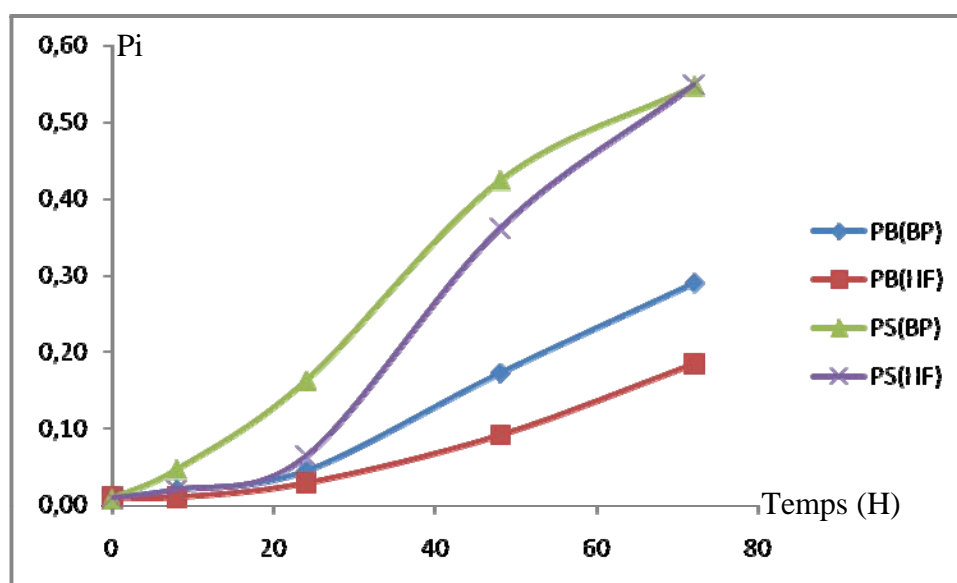


Figure III 25 : Evolution de l'index Palmitique en fonction du temps après catalyse à la lipase papaye PB et PS des différents mélanges beurre (BP)/palmitate d'éthyle ou huile fractionnée (HF)/ palmitate d'éthyle (ratio : 1/5)

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé la graine de *P. butyracea* de différentes régions de productions au Bénin, à travers la caractérisation de son beurre et des tourteaux délipidés. Puis nous nous sommes intéressés à la modification du beurre pour l'obtention d'un substitut de beurre de cacao au moyen de lipases microbiennes et végétales.

La détermination de la composition des macroéléments biochimiques montre que la graine de *P. butyracea* est essentiellement oléagineuse. La composition en acide gras du beurre montre qu'elle est composée majoritairement des acides gras oléique et stéarique ce qui en fait une bonne huile de friture. La composition en triacylglycérols quant à elle est marquée par la présence de deux triacylglycérols à savoir le SOS et SOO. La fraction insaponifiable de l'ordre de 1,5% présente dans sa fraction stérolique le stigmastérol comme composé majoritaire des phytostérols tandis que le β -tocophérol est le tocophérol majoritaire. Son tourteau peut être utilisé comme complément alimentaire pour les animaux surtout dans le cas des ruminants ; toutefois une utilisation dans l'alimentation des monogastriques nécessiterait de tenir compte des variétés utilisées, de la période de récolte, des traitements technologiques et du coût des formulations à effectuer. Cependant, la domestication de cette plante permettrait la diversification des sources de corps gras pour les pays africains producteurs comme le Bénin.

L'utilisation du beurre de *P. butyracea* dans la synthèse d'un équivalent de beurre de cacao a permis de tester l'aptitude de plusieurs lipases tant du point de vue de leurs spécificités que de leur efficacité dans l'incorporation de l'acide palmitique dans le beurre.

Ainsi, la synthèse n'a pu être possible avec la lipase de *Candida Antartica* bien que sa capacité à incorporer l'acide palmitique était importante tant en acidolyse qu'en transestérification. La spécificité de cette lipase a été un frein à l'obtention du produit désiré tant avec la beurre qu'avec le beurre fractionné. Bien que la lipase de papaye ait montré ses aptitudes en acidolyse et en transestérification en position *Sn-1,3* dans divers travaux de la littérature, elle n'a pu être efficace dans la synthèse d'un équivalent de beurre de cacao à partir du beurre de *P. butyracea* et de sa fraction. En effet, spécifique aux acides gras à courtes chaînes la lipase de papaye s'est révélée inefficace au remplacement de l'acide stéarique ou oléique par l'acide palmitique. Quant à la lipase de *Thermomyces lanuginosa* de

très faible efficacité en acidolyse, elle a permis à travers la transestérification de modifier considérablement les propriétés rhéologiques de la matière grasse de départ. Ainsi, l'incorporation de l'acide palmitique a permis d'obtenir un équivalent de beurre de cacao avec une composition semblable et des caractéristiques physiques très proches du beurre de cacao.

L'évaluation des paramètres de synthèse (effet de l'activité de l'eau, de la température, du solvant), a permis de mettre en évidence l'efficacité de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* à faible activité de l'eau, à des températures élevées et dans les solvants apolaires.

Loin d'être achevée, l'étude de la caractérisation du beurre de *P. butyracea* doit être poursuivie afin de permettre une identification complète de sa fraction insaponifiable et de trouver des critères de classification par régions et par variétés à isoler.

Quant à la modification du beurre, bien qu'elle soit concluante avec la lipase *Thermomyces lanuginosa*, des études en milieu dépourvu de solvant doivent être entreprises. De plus, de nouvelles sources de lipases doivent être expérimentées pour obtenir une gamme assez variée de possibilités.

1. Abbiw D. K.
Useful plants of Ghana: African uses of wild and cultivated plants. Intermediate technology publications and the royal botanic Gardens, Kew, london. 337p (1990)
2. Abigor R. D., W. N. Marmer, T. A. Folgias, K. C. Jones, R. J. DiCiccio, R. Ashby, and P. O. Uadia
Production of cacao butter-like fats by lipase-catalysed interestérification of palm oil hydrogenated soybean oil
J Am Oil Chem Soc 80 : 1193-1196 (2003)
3. Adjanohoun, E.J., Ayri, A.M.R., Ake Assi, L., Baniakina, J., Chibon, P.
Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo. Ed. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris. P605 (1988).
4. Adomako D.
Fatty acid composition and characteristics of *P. butyracea* fat extracted from Ghana seeds,
J Sci Food. Agric 28: 384–386 (1977).
5. Agbo N’zi G., Chatigre O. and R. E. Simard
Canarium schweinfurthii Engl. : Chemical composition of the fruit pulp
J. Am. Oil Chem. Soc. 64: 317-320 (1992)
6. Akoh C.C.
Structured lipids. In: Akoh CC and Min DB, editors. Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology. New York: Marcel Dekker. : 699-727. (1998).
7. Ambé G.A.
Les fruits sauvages comestibles des savanes guinéennes de Côte-d’Ivoire : état de la connaissance par une population locale, les Malinké.
Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 5: 43-48 (2001)
8. deJong A., J. Plat, R. P. Mensink
Metabolic effects of plant sterols and stanols
Journal of Nutritional Biochemistry 14: 362–369 (2003)
9. Aubreville A.
Flore forestière soudano-guinéenne AOF – Cameroun – AEF. Office de la Recherche Scientifique Outre-Mer. Société d’Editions Géographiques Maritimes et Coloniales, Paris. 523p.(1950).
10. Awad A.B., Chen Y.C., Fink C.S., Hennessey T.
Beta-sitosterols inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids.
Anticancer Res 16: 2797–2804 (1996)
11. Awad A.B., Hartati M.S., Fink C.S.
Phytosterol feeding induces alteration in testosterone metabolism in rat tissues.
J Nutr Biochem 9: 712–717 (1998)

12. Bamps P.
Répartition de *P. butyracea butyracea* en Afrique. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 41: 430.(1971)
13. Baumer, M.
Arbres, arbustes et arbrisseaux nourriciers en Afrique occidentale. Dakar : Enda Tiers-Monde, 260 p (1995).
14. Bell, S. and Bistran, B.R.
In: Christophe, AB. (Eds), *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, Page 189, AOCS Press, Champaign.(1998)
15. Berger M., Laumen K., Schneider M. P.
Lipase-catalyse estérification of hydrophilic diols in organic solvents.
Biotech. Lett. 14: 553-558,(1992).
16. Somashekar B. R. and S. Divakar
Lipase catalyzed synthesis of L-alanyl esters of carbohydrates.
Enzyme and Microbial Technology 40 : 299-309 (2007)
17. Blair S.N., Capuzzi D.M., Gottlieb S.O., Nguyen T., Morgan J.M., Cater N.B.
Incremental reduction of serum total cholesterol and lowdensity- lipoprotein cholesterol with the addition of plant stanol estercontaining spread to statin therapy.
Am J Cardiol 86 :46–52 (2000)
18. Bloomer S., P. Adlercreutz and B. Mattiasson
Triglyceride interesterification by lipases. .Cacao Butter Equivalents From a Fraction of Palm
J Am Oil Chem Soc 67 : 519-524 (1990)
19. Borobou-Borobou H.
Biologie et domestication de quelques arbres fruitiers de la forêt du Gabon. Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II. Institut de Botanique. 320p. (1994)
20. Bouscholte, M.
Verwachte EU-goedkeuring plantaardige vetten geeft chocolade nieuwe marktkansen.
Food Management 23 : 12-15. (1994)
21. Brink, L.E.S. and Tramper, J.
Optimization of organic solvents in multiphase biocatalysis.
Biotechnol. Bioeng. 27: 1258-1269. (1985).
22. Brinkmann, B.
Kakaobutteraustauschfette.
Zucker and Stisswarenwirtschaft 8 : 268-270. (1992)
23. Cantacuzene D., Pascal F., Guerreiro C.,
Synthèse of amino acid esters by papain.
Tetrahedron 43 (1987)

24. Cao G. & Prior R. L.
Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples.
Methods in Enzymology 299: 50–62. (1999).
25. Caro Y., Villeneuve P., Pina M., Reynes M., Graille. J
Investigation of crude latex from various carica Papaya varieties for lipid bioconversions,
J. Am. Oil.Soc. 77: 891-901(2000)
26. Caro Y., Pina M., F. Turon, S. Guilbert, E. Mougeot, D.V. Fetsch, P. Attwood, J. Graille.
Plant lipases: Biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions.
Biotechnology and Bioengineering 77 (6) : 693-703 (2002)
27. Caro, Y., Turon, F., Villeneuve P., Pina M., Graille, J.
Enzymatic synthesis of medium-chain triacylglycerols by alcoholysis and interesterification of copra oil using a crude papain lipase preparation.
Eur. J. Lipid Sci. Technol. 106 :503-512 (2004)
28. Cater N.B., Howard J.H., Denke M. A.
Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans.
Am J Clin Nutr 65: 41-45 (1997).
29. Chang M, Abraham G.
Production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils.
J Am Oil Chem Soc 67: 832–834 (1990)
30. Child P, Kuksis A.
Critical role of ring structure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations in vitro.
J Lipid Res 24: 1196–1209 (1983)
31. Child P., Kuksis A.
Investigation of the role of micellar phospholipid in the preferential uptake of cholesterol over sitosterol by dispersed rat jejunal villus cells.
Biochem Cell Biol 64:847–853 (1986)
32. Chong C., Hoh Y., Wang C.
Fractionation procedures for obtaining cocoa butter like fat from enzymatically interesterified palm olein.
J Am. Oil. Chem. Soc 69: 137–140 (1992)
33. Christie W. W.
The positional distribution of fatty acid in natural glycerides of vegetable origin.
Chemistry and industry 7: 1214 – 1223 (1986)
34. deMan J. M.
Principles of foods chemistry Third Edition 33-107 (1999)

35. Dencausse L., Nsourankoua H., Artaud J., and Clamou J.L.
Comparaison des compositions lipidiques des beurres de *P. butyracea* et de Karité.
OCL 2 :143-147(1995)
36. Derbesy M., Richert M. T.
Détection du beurre de karité dans le beurre de cacao.
Oléagineux, 34 : 405-409(1979)
37. Dhuique-mayer C., Villarreal L., Caro Y., Ruales J., Villeneuve P., Pina M.
Lipase activity in alcoholysis and esterification reactions of crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*)
OCL 10 :232-234 (2003)
38. Di-Vincenzo, D., Maranz S., Serraiocco A., Vito R., Wiesman Z. and Bianchi G.
Regional Variation in Shea Butter Lipid and Triterpene Composition in Four African Countries.
J. Agric. Food Chem. 53: 7473-7479 (2005)
39. Djago Y. A., Kpodekon M. et Lebas F.
Conduire son élevage (alimentation & reproduction) ; Méthodes et Techniques d'Élevage du Lapin :
Élevage du lapin en milieu tropical (2^{ième} Edition) : 27-41 (2007)
40. Castillo E, Torres-Gavilán A., Severiano P., Arturo N.
Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues
Food Chemistry 100 (3) :1202-1208 (2007)
41. El Zant A., Pina M., Graille J., Grimaud J., Renard G.
Synthèse enzymatique d' α monoglycérides en milieu biphasique.
Oléagineux, 43, 355-358, (1988).
42. Enaud E., Humeau C., Piffaut B., Girardin M.
Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 27: 1–6 (2004)
43. Evrard J.
Les tourteaux d'oléagineux, source de protéines en alimentation animale
OCL 12 : 224-227 (2005)
44. Faber K. and Riva S.
Enzymatic catalyzed irreversible acyl transfer.
Synthesis. 895-910 (1992)
45. Ferrer M., Soliveri J., Plou F. J., López-Cortés N., Reyes-Duarte D., Christensen M., Copa-Patiño J. L. and Ballesteros A.
Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties
Enzyme and Microbial Technology 36(4): 391-398(2005)

46. Foglia, T. A. and Villeneuve P.,
Carica papaya latex-catalysed synthesis of structured triacylglycerols.
J. Am. Oil. Chem. Soc. 74 : 1447-1450. (1997)
47. Fomuso L. B., Akoh C. C.
Lipase catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-packed bed bioreactor
Food Research International 35: 15-21 (2002)
48. Plou F. J., Angeles Cruces M., Ferrer M., Fuentes G., Pastor E., Bernabé M., Christensen M.,
Comelles F., Parra J. L. and Ballesteros A..
Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme,
support and solvent.
Journal of Biotechnology 96(1): 55-66 (2002)
49. Frankel E. N. et Dutton H. J.
Hydrogenation with homogeneous and heterogeneous catalysts. In Topics in lipid chemistry. Vol. 1,
ed. F. D. Gunstone. London: Logos Press,Ltd. (1970)
50. Fu X., Zhu X., Gao K., and Duan J.
Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus sp*
J Am Oil Chem Soc. 72, 527-531, (1995)
51. Fulkal.L., Kas J.,
the role of active and inactivated papaïn in beer chillproofing,
J. inst. Brew., 90 :247-249 (1984)
52. Graille J.
Procédé de synthèse d'esters d'acides organiques et d'alcools en phase hétérogène par catalyse
enzymatique.
Brevet français n° 85 14827, (1985).
53. Grondin I., Smadja J., Farines M. et Soulier J.
Répartition des acides gras en positions interne et externes des triacylglycerols de deux huiles
cyclopropaniques : letchi et longani.
OCL 4: 459 – 463 (1997)
54. Gunstone F.D.
The distribution of fatty acid in natural glycerides of vegetable origin.
Chemistry and industry 7: 1214 – 1223. (1962).
55. Gunstone F.D., Hamilton R.J., Padley F.B., M.I. Qureshi.
Glyceride studies V. The distribution of unsaturated acyl groups in vegetable triglycerides.
J Am. Oil. Chem. Soc 42: 965 – 970. (1965)
56. Gylling H., Miettinen T. A.
Cholesterol reduction by different plant stanol mixtures and wit variable fat intake.
Metabolism 48: 575–580. (1999)

57. Hallikainen M.A., Uusitupa M.I.
Effects of two low-fat stanol estercontaining margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects.
Am J Clin Nutr 69:403–10 (1999)
58. Hannun Y.A., Lincard C.M.
Sphingomyelin breakdown products: Antiproliferative and tumor suppressor lipids.
Biochim Biophys Acta 1154: 223–236 (1994).
59. Hecketsweiler. P., Mokoko Ikonga J.
La Réserve de Conkouati, Congo; le secteur sud-est. UICN, Gland (Suisse). (1991).
60. Herbert J.P., Scriban R., Strobbe B.
Analytical study of proteolytic enzymes for beer stabilisations.
ASBC journal, 36: 31-38 (1977)
61. Hirayama, O., Takagi, M., Hukamoto, K., & Katoh, S.
Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence.
Analytical Biochemistry, 247, 237–241(1997).
62. Hladik, C.M., Bahuchet, S., et Garine, I
Se nourrir en forêt équatoriale. Ed UNESCO/MAB,
Brunoy (France). 96p (1989).
63. Hounbédji A.
Étude phytotechnique, écologique et des technologies endogènes de transformation du *Pentadesma butyracea*, espèce des galeries forestières de la région de Bassila. Mémoire du DEAT, LTAM,
Sékou, Bénin. ; 59p (1997)
64. Hoy, C-E., Christensen, M.S., Redgrave, T. and Tso, P.
In: Christophe, AB. (Eds), Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use, Page 160, AOCS Press, Champaign. (1998).
65. Ikeda I, Sugano M.
Some aspects of mechanism inhibition of cholesterol absorption by b-sitosterol.
Biochim Biophys Acta 732:651–658. (1983)
66. Irimescu R. and Katsuya Kato
Lipase-catalyzed enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids.
Tetrahedron Letters 45 (3):523-525 (2004)
67. Jakulj L., Mieke D. Trip, Thomas Sudhop, Klaus von Bergmann, John J. P. Kastelein, and Maud N. Vissers.
Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe: effects on plasmalipid levels. *J. Lipid Res.* 46: 2692–2698 (2005)

68. Jennings B., C.C. Akoh,
Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids,
J. Am. Oil Chem. Soc. 76:1133–1137. (1999)
69. Jennings B. H., C. C. Akoh
Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid
Food Chemistry 72 : 273-278 (2001)
70. Jitender S., D. Batovska, Y. Kuwamori and Y. Asano
Enzymatic chemoselective synthesis of secondary-amide surfactant from *N*-methylethanol amine
Journal of Bioscience and Bioengineering, 100 (6) : 662-666 (2005)
71. Jones P.J.H, Ntanos F.Y., Raeini-Srjaz M., Vanstone C.A.
Cholesterol lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men.
Am J Clin Nutr 69:1144–50.(1999)
72. Karliskind A.
Manuel des corps gras, principaux constituants chimiques des corps gras
Lavosier Tec. Doc ed.Paris p1579 (1992)
73. Khaled N., Montet D., Farines M., Pina M., Graille J.,
Synthèses des monoesters de sucre par biocatalyse. Oléagineux, 47, 181-189, (1992).
74. Khaled N., Montet D., Pina M., Graille J.,
Fructose oleate synthesis in a fixed bed reactor. Biotech. Lett. , 13, 167-172, (1991).
75. Kouadio K. G., Kossa A., A. Kamenan
Potentialités nutritionnelles de la graine de lami *P. butyracea butyracea Sabine*
Agronomie Africaine 2 (2) : 126-129(1990)
76. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. et Veeger, C.
Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents.
Biotechnol. Bioenerg. 30: 81-87(1987).
77. Lai O. M, C. T. Low, C.C. Akoh
Lipase catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in continuous bench-scale packed bed bioreactor
Food chemistry 92: 527-533 (2005)
78. Lambelet, P.
comparison of NMR and DSC methods for determining solid content of fats
Application to cacao butter and its admixtures with milk fat. p188-190 Nestlé Research News(1986)
79. Lambelet, P., Raemy, A.,
Isosolid diagrams of fat from thermal analysis data.
JAOCS 60 (4), 845–84 (1983).

80. Langrand G., Rondot N., Triantaphylides C., Baratti J.
Short-chain favour ester synthesis by microbial lipases.
Biotech. Lett. 13: 339-344,(1990)
81. Law M.
Plant sterol and stanol margarines and health.
BMJ. 20(7238):861-864 (20003)
82. Leikin AI, Brenner RR.
Fatty acid desaturase activities are modulated by phytosterol incorporation in microsomes.
Biochim Biophys Acta 1005:187–191(1989)
83. Lipp M.; Anklam E.
Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate-Part A. Compositional data food
Chemistry 62 (1):73-97 (1998)
84. Lozano P., Avellande A. Iborra J. L.,
Peptide synthesis by papaïn in alkali halide media
Biocat. Biotrans. 13 : 255-269 (1996)
85. Lucas Edmumd W and Hernandez Ernest
Isopropyl Alcool in Technology and solvents for extracting oilseeds and nonpetroleum oils (Chapitre
15) : 199-266 AOCS Press Illinois (1997)
86. Lucas, A., Quinlan, P., Abrams, S., Ryan, S., Meah, S. & Lucas, P. J
Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants.
Arch. Dis. Child. 77: 178–184 (1997)
87. Macrae A. R. and Hammond R. C.
Present and futur application of lipases, *Biotechnol.*
Genet. Eng. Rev. 3, 193-219 (1985)
88. Makita-Madzou, J.P.
Etude morphologique et phytogéographique des fruits comestibles de la flore spontanée du Congo.
Thèse de Doctorat 3ème cycle. Université d.Orléans. 159p. (1985)
89. Manjon A., Iborra L. L., Arocas A.
Short-chain favour ester synthesis by immobilized lipase in organic media.
Biotech. Lett. 13: 339-344,(1990)
90. Maranz Steven, Zeev Wiesman, and Nissim Garti
Phenolic Constituents of Shea (*Vitellaria paradoxa*) Kernels
J. Agric. Food Chem, 51 : 6268-6273 (2003)
91. Maranz Steven and Zeev Wiesman.
Influence of Climate on the Tocopherol Content of Shea Butter.
J. Agric. Food Chem. 52: pp. 2934-2937 (2004)

92. Marigo G.
Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux.
Analisis 2:106-110 (1973)
93. Maud Cansell
Impact de la cristallisation des corps gras sur les propriétés des produits finis
OCL 12 : 427-431 (2005)
94. Meguro S, Higashi K, Hase T, Honda Y, Otsuka A, Tokimitsu I, Itakura H.
Original communication. Solubilization of phytosterols in diacylglycerol versus triacylglycerol improves the serum cholesterol lowering effect. *Eur J Clin Nutr* 55:513–7. (2001)
95. Mettlin C.
Clinical oncology update: prostate cancer. Recent developments in the epidemiology of prostate cancer. *Eur J Cancer* 33:340–347.(1997)
96. Miettinen TA, Gylling H.
Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols.
Curr Opin Lipidol 10: 9–14 (1999)
97. Mitin Y.V., Braun K., Kuhl P.
Papain catalyzed synthesis of esters of N-protected amino acids and peptides for use in trypsin catalysed peptide synthesis.
*biotechnol.Bioneng.*54:287-290 (1997)
98. Mojovic L, Siler-Marinkovic S, Kukic G, Vunjak-Novakovic G.
Rhizopus arrhizus lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat.
Enzyme Microb Technol 15: 438–443(1993)
99. Montet D., Marcou L., Graille J., Servat F., Renard G.
Etude de l'acylation des aminopropanols catalysée par les acyltransférases.
Rev. Fse Corps Gras, 36, 79-83, (1989).
- 100 Montet D., Pina M., Graille J., Renard G., Grimaud J.
Synthesis of N lauryloleamide by the *Mucor miehei* lipase in an organic medium.
Fat Sci. Technol., 91, 14-18,(1989b).
- 101 Montet D., Servat F., Pina M., Graille J., Galzy P., Arnaud A., Ledon H. Marcou L.
Enzymatic synthesis of N- acyllsines
J Am Oil Chem Soc. 67, 771-774, (1990)
- 102 Morinière J. L.Danree B., Guy A.,
Utilisations des hydrolases en chimie organique:synthèse de liaisons ester et amide catalysée part la papaine industrielle.
Eur J. med.Chem. 22 :347-357(1987)

- 103 Mu H et Hoy C-E.,
The digestion of dietary triacylglycerols.
Progress in lipid Research, (43) p.105-133 (2004)
- 104 Mu H. and T. Porsgaard
The metabolism of structured triacylglycerols
Progress in Lipid Research 44: 430 - 448 (2005)
- 105 Mu H. and C-E. Høy
Intestinal absorption of specific structured triacylglycerols
Journal of Lipid Research 42: 792 -798 (2001)
- 106 Mukesh K. M., J.R.C. Reddy, B.V.S.K. Rao, R.B.N. Prasad
Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor
Bioresource Technology 98 : 1260–1264 (2007)
- 107 Natta A.K.
Ecological assessment of riparian forests in Benin: Phytodiversity, phytosociology, and spatial distribution of tree species. Ph.D. University of Wageningen, Pays-Bas. pp.73-88.(2003)
- 108 Osborn H. T. and C.C. Akoh
Structured Lipids Novel Fats with Medical Nutraceutical, and Food Applications. Comprehensive reviews in food science and food safety 3:110-120 (2002)
- 109 Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L.
Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4619–4626 (2001).
- 110 Plat J, Kerckhoffs D. A., Mensink R. P.
Therapeutic potential of plantsterols and stanols.
Curr Opin Lipidol 11:571–576. (2000)
- 111 Plat J., Mensink R. P.
Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk.
Nutr Metab Cardiovasc Dis 11:31–40 (2001)
- 112 Plat J., Mensink R. P.
Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects.
Am J Cardiol. 2005 Jul 4;96(1A):15D-22D.
- 113 Plat J, Mensink R. P.
Vegetable oil based versus wood based stanol ester mixtures: effect on serum lipids and hemostatic factors in nonhypercholesterolemic subjects.
Atherosclerosis 148:101–112 (2000)
- 114 Purba K. & Sumarua E.
Chemical analysis of twenty seven woods from West-Java.
Journal Penelition Hastily Hustan 4: 23-29 (1987)

- 115 Quinlan P. and S. Moore
Modification of triglycerides by lipases: Process technology and its application to the production of nutritionally improved fats.
INFORM 4: 580-585 (1993)
- 116 Rachman O., Balfas J.
Sifat Penesinan jenis kayu Jawa barat-Machining properties of wood species from west Java.
journal Penelitian Hasil Hutan 4 : 54-64 (1987)
- 117 Rao P.S. and Mueller H.S.,
Lipid peroxidation and acute myocardial ischemia.
Adv. Exp. Med. Biol., 161:347-362 (1983).
- 118 Re R., Pelligrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., & Rice-Evans C. A.
Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26: 1231–1237. (1999).
- 119 Renard G., Grimaud J., El Zant A., Pina M., Graille J.
Effet des solvants organiques sur la synthèse enzymatique de glycérides partiels en milieu biphasique. Oléagineux, 45 : 337-340, (1990).
- 120 Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W.
Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. Food Chemistry, 66, 401–436. (1999).
- 121 Rogalska E., C. Cudrey, F. Ferrato, and R. Verger.
Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases.
Chirality 5:24-30(1993)
- 122 Ronald, L.B., & Bexley, H.,. Cocoa butter substitutes and product containing them. U.S. Patent 2975060. (1961)
- 123 Salen G, Ahrens Jr EH, Grundy SM.
Metabolism of b-sitosterol in man.
J Clin Invest 49: 952–967. (1970)
- 124 Saran M., Tait D., Bors W. and Michel C.
Formation and reactivities of alkoxy radicals. In Oxy Radicals and Their Scavenger Systems (Cohen G. and Greenwald R.A. eds.), Vol. 1, pp. 20-25, Elsevier Biomedical, New York (1983).
- 125 Schreckenber K.
Forêts, champs, et marchés : une étude des produits d'arbres indigènes des savanes boisées de la région de Bassila au Bénin. Thèse de doctorat, département de géographie ; École des études orientales et africaines, Université de Londres, 137 p.(1996)
- 126 Schuch R., Mukherjee K. D.
Lipase-catalysed reaction of fatty acids with glycerol and acylglycerols. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 332-336 (1991).

- 127 Seino H., Uchibori T., Nishitani T., Inamasu S.
Enzymatic synthesis of carbohydrate ester of fatty acid. 1-esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. J. Am. Oil Chem. Soc. 61:1761-1765, (1984).
- 128 Servat F., Montet D., Pina M., Galzy P., Arnaud A., Ledon H. Marcou L., Graille J.
Synthesis of fatty hydroxamic acids catalysed by the lipase of *Mucor miehei*
J Am Oil Chem Soc. 67: 646- 649 (1990).
- 129 Shimada Y, Ogawa J, Watanabe Y, Nagao T, Kawashima A, Kobayashi T, Shimizu S
Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase
LIPIDS 38 (12): 1281-1286 (2003)
- 130 Silva E.M. , J.N.S. Souza, H. Rogez, J.F. Rees, Y. Larondelle
Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region.
Food Chemistry 101 : 1012–1018 (2007)
- 131 Sinsin B., and T. A. Sinadouwirou.
Valorisation socio-économique et pérennité du *Pentadesma butyracea* Sabine en galeries forestières au Bénin.
Cahiers d'études et de recherches francophones/Agriculture 12: 75-79 (2003).
- 132 Small D. M.
The physical chemistry of lipids.
Handbook of lipid research. New York : Plenum Press, (1986).
- 133 Solis-Fuentes J.A. and M.C. Duran-de-Bazua
Mango seed uses: thermal behaviour of mango seed almond fat and its mixtures with cocoa butter.
Bioresource Technology 92:71–78(2004)
- 134 Solis-Fuentes J.A. and M.C. Duran-de-Bazua,
Characterization of eutectic mixtures in different natural fat blends by thermal analysis. European Journal of Lipid Science and Technology, 105 : 742 - 748(2003).
- 135 Soumanou M. M. , U. T. Bornscheuer U. Menge and R. D. Schmid
Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase
J. Am. Oil Chem. Soc. 74:427-433.(1997)
- 136 Soumanou M. M. , U. T. Bornscheuer and R. D. Schmid
Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides
J. Am. Oil Chem. Soc. 75:703-710.(1998a)
- 137 Soumanou M. M. , U. T. Bornscheuer, U. T. Schmid and R. D. Schmid
Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis
Fett/lipid 100 :156-160 (1998b)

- 138 Soumanou M. M. , U. T. Bornscheuer, U. T. Schmid and R. D. Schmid
Crucial role of support and water activity on the lipase catalyzed synthesis of structured triglycerides
Biocatalysis and Biotransformation 16 :443-459 (1998c)
- 139 Sridhar R, Lakshminarayana G, Kaimal T.
Modification of selected Indian vegetable fats into cocoa butter substitutes by lipase-catalyzed ester interchange.
J Am Oil Chem Soc 68:726–30.(1991)
- 140 Tai D. F. Fu S. L, Chuang S F., Tsai H.
Papain catalyzed esterification in polar organic solvents.
Biotech. Lett, 11, 1989,173-176
- 141 Tanaka, Y., Irinatsu, Y., Noguchi, A. & Kobayashi, T
Substitute composition for cocoa butter. U.S. Patent 4705692 (1987)
- 142 Tapiero H., D.M. Townsend , K.D. Tew
Phytosterols in the prevention of human pathologies.
Biomedicine & Pharmacotherapy 57: 321–325 (2003)
- 143 Tchobo F. P. , Natta A. K., B. Barea, N. Barouh, G. Piombo, M. Pina, P; Villeneuve, M. M. Soumanou and D. C. K. Sohounhloue
Characterization of *Pentadesma butyracea sabine* Butters of Different Production Regions in Benin
J. Am. Oil Chem. Soc. 84 (8) : 755-760 (2007)
- 144 Timms R. E.
Phase behaviour of fats and their mixtures.
Prog Lipid Res 23 : 1-38.(1984).
- 145 Tuani G. K., Cobbinah J. R., Agbodaze P. K.
Bioactivity of and phytochemical studies on extractives from some Ghanaian plants.
Journal of Forestry (Accra, Ghana) 1 : 44-48 (1994)
- 146 Undurraga Daniel, Andre´s Markovits, Sonia Erazo
Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction.
Process Biochemistry 36: 933–939(2001)
- 147 Villeneuve P. and T. A. Foglia
Lipase specificities: Potential application in lipid bioconversions.
Inform 8 (6) : 640-650 (1997)
- 148 Villeneuve P., N. Barouh, B. Barea, G. Piombo, M.C. Figueroa-Espinoza, F. Turon, M. Pina, R. Lago.
Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position
Food Chemistry 100 :1443–1452 (2007)
- 149 Vivien J., Faure J.J.
Arbres des forêts d’Afrique Centrale. Ministère des Relations Extérieures de la Coopération et du Développement. Paris, France. 526 p (1985)

- 150 Vulfson E. N.
Enzymatic synthesis of foods ingredients in low water media trends in food.
Science & Technology 3: 209-215(1993)
- 151 Wakako T.
Acidolysis between triloein and short-chain Fatty Acid by lipase inn organic solvents
Biosci. Biotechnol. Biochem., 67(7): 1256-1261. (2005)
- 152 Wang H. X., H. Wu, C. T. Ho, X. C. Weng ,
Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters
Food Chemistry 97 : 661–665(2006)
- 153 Wojdyło A., J. Oszmian´ski, and R. Czemerys
Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs.
Food Chemistry 105 :940–949 (2007)
- 154 Wolff R.A., Dobrowsky R.T., Bielawski A., Obeid L.M., HannunY.A.
Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide mediated signal transduction.
J Biol Chem 269:19607–19609.(1994)
- 155 Xu, X.
Production of specific-structured triacylglycérols
by lipase-catalyzed reactions: a review.
Eur. J. Lipid Sci. Technol. 102 : 287-303(2000)
- 156 Yamane T.
Enzyme technology for the lipid industry : an engineering overview.
J Am Oil Chem Soc. 64: 1657-1662, (1987)
- 157 Yesiloglu,Y
Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil
J Am Oil Chem Soc 81 (2): 157-160 (2004)
- 158 Yokozeki K., S. Yamanaka, K. Takinami, Y. Hirose, A. Tanaka, K. Sonomoto, and S. Fukui.
Application of immobilized lipase to regiospecific interestérification of triglyceride in organic
solvent *Eur. J. Appl. Microbiol.Biotechnol.* 14: 1-5 (1982)
- 159 Zhang H., X. Xu, J. Nilsson, H. Mu, J. Alder Nissen and C-E. Hoy
Production of margarine fats by enzymatic interestérification with silica granulated *Thermomyces*
lanuginosa lipase in a large-scale study
JAOCS 78:57-64.(2001)
- 160 Merritt C., Vajdi M., Kayser S. G., Halliday J. W. and Bazinet M. L.
Validation of computational methods of triglyceride composition of fats and oils by liquid
chromatography and mass spectrometry.
JAOCS 59: 422-432(1952)

Résumé

Ce travail a consisté à caractériser le potentiel nutritionnel de la graine de *Pentadesma butyracea Sabine* récolté dans diverses zones de production du Bénin et à évaluer la possibilité de produire un équivalent de beurre de cacao par transfert acyle sélectif utilisant des lipases microbiennes et végétales.

L'évaluation du potentiel nutritionnel a montré que la graine de *Pentadesma butyracea Sabine* est essentiellement lipidique. Le beurre obtenu est caractérisé par la présence de deux acides gras, l'acide stéarique et l'acide oléique. Le profil triglycéridique des différents beurres est marqué par la présence de deux triacylglycérols majoritaires. Le stérol majoritaire a été le stigmastérol alors que le β -tocophérol est le tocophérol majoritaire.

La production d'équivalent de beurre de cacao a été réalisée à l'aide de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* par transestérification en milieu organique. Les thermogrammes des produits obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sont semblables à celui du beurre de cacao. Les facteurs cinétiques tels que la teneur en eau, la température et la nature du solvant ont été étudiés.

Mots clés : *Pentadesma butyracea Sabine*, triacylglycérols, caractérisation chimique, beurre de cacao, transestérification, lipases.

Summary

This work consisted in characterizing the nutritional potential of the *Pentadesma butyracea Sabine* kernels collected in various zones of production in Benin, and evaluating the possibility to produce cocoa butter equivalent by selective acyle transfer reactions using microbial and plant lipases.

The nutritional potential showed that the *Pentadesma butyracea Sabine* kernels contain essentially lipid compound. The butter obtained is characterized by the presence of two fatty acids, stearic acid and oleic acid. In addition, the triacylglycerols profile of the different butters is marked by the overwhelming presence of the two triacylglycerols. The predominance sterol is stigmasterol whilst the β -tocopherol is the main tocopherol.

The production of cocoa butter equivalent was carried out using the lipase of *Thermomyces lanuginosa* by transesterification in organic medium. The thermograms of the products obtained by differential scanning calorimetric (DSC) were similar to that of the cocoa butter. The kinetic parameters such as water content, temperature, and solvent polarity were optimized.

Keys words: *Pentadesma butyracea Sabine*, chemical characterization, cocoa butter, transesterification, lipases.